Berlijn 1961

WISSENSCHAFTLICHE ZEITSCHRIFT DER HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE REIHE · JG. X (1961) 5
WISS. Z. HUMBOLDT-UNIV. BERLIN, MATH.-NAT. R. X (1961)

Als Manuskript gedruckt

Aus dem Institut für Medizin und Biologie, Bereich Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. F. JUNG),
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
Forschungsgemeinschaft der naturwissenschaftlichen, technischen und medizinischen Institute

Zur Pharmakologie von Staphylokokkentoxin*

Von BURKHARD WIEGERSHAUSEN

INHALT

I. Einführung
Problematik und Aufgabe

II. Material
1. Staphylokokkentoxin, Herstellung und Chargen
2. Substanzen
3. Tiere
4. Zur Nomenklatur

III. Die Wirkung von Staphylolysin (S) an isolierten Organen
1. Die Wirkung von Staphylolysin auf Abschnitte des Verdauungstraktes
Einleitung und allgemeine Methodik
1.1 Wirkung von S auf das Ileum des Meerschweinchens
1.2 Wirkung von S auf das Ileum der Ratte
1.3 Wirkung von S auf den Magenstreifen der Ratte (mit Methodik)
1.4 Wirkung von S auf das Duodenum der Ratte
1.5 Wirkung von S auf das Duodenum von Kaninchen
1.6 Wirkung von S auf das Colon der Ratte
1.7 Wirkung von S auf das rectale Coecum des Huhnes
2. Die Wirkung von Staphylolysin auf den isolierten Uterus
2.1 Wirkung von S auf den Uterus der Ratte
Einleitung und Methodik
2.11 Dosis/Wirkungsbeziehungen
2.12 Die Latenzzeit
2.13 Vergleich von zwei Chargen S
2.14 Einflußnahme auf die S-Reaktion während der Latenzzeit
2.15 Einfluß von Antagonisten auf die S-Reaktion am Uterus (mit Methodik)
2.15.1 Einfluß von Adrenalin
2.15.2 Einfluß von Atropin
2.15.3 Einfluß von Lysergsäurediäthylamid
2.15.4 Einfluß von Cepentyl
2.15.5 Einfluß von Reserpin
2.15.6 Einfluß von Chlorpromazin
2.16 Einfluß von Prostigmin
2.17 Wirkung von auf 100 °C erhitztem S
2.18 Der Einfluß der Lagerungstemperatur auf die pharmakologische Aktivität von S
2.19 Wirkung von unbeimpftem Kulturmedium auf den Uterus
2.2 Wirkung von S auf den isolierten Uterus des Meerschweinchens
Zusammenfassung der Befunde III, 1 und 2
3. Die Wirkung von Staphylolysin auf andere isolierte Organe verschiedener Spezies
3.1 Wirkung von S auf isolierte Herzen
3.11 Wirkung von S auf das Herz von Kaninchen (mit Methodik)
3.12 Wirkung von S auf das Herz von Hühnern
3.13 Wirkung von S auf das Herz von Helix pomatia
3.2 Wirkung von S auf Herzvorhofstreifen (mit Methodik)
3.21 Wirkung von S auf das Herzvorhofpräparat des Kaninchens
3.22 Wirkung von S auf das Herzvorhofpräparat des Meerschweinchens
3.23 Wirkung von S auf das Herzvorhofpräparat der Ratte
3.3 Wirkung von S auf die Gefäße des isolierten Kaninchenohres (mit Methodik)
Zusammenfassung der Befunde III, 3

IV. Zur Toxizität von Staphylokokkentoxin
1. Die letale Wirkung von Staphylolysin
Einleitung und Methodik
1.1 Das Vergiftungsbild nach S-Applikation
1.2 Der Einfluß von Lagerungsdauer und -temperatur auf die letale Wirkung der Staphylolysine
1.3 Vergleich der letalen Wirkung verschiedener Staphylolysine
1.4 Einfluß von Alter und Geschlecht der Mäuse auf die letale Wirkung von S
1.41 Suszeptibilität und Alter
1.42 Geschlechtsspezifische Einflüsse
1.5 Die letale Wirkung von S und die Suszeptibilität verschiedener Tierarten
Zusammenfassung der Befunde IV, 1
2. Die hämolytische Wirkung von Staphylolysin
Einleitung und Methodik
2.1 Die Abhängigkeit der S-Hämolyse von Zeit und Lysinkonzentration
2.2 Vergleich Zeit/Konzentrationskurven bei Erythrozyten verschiedener Spezies
2.3 Der Einfluß der Zellzahl auf die S-Hämolyse

*Habilitationsschrift Berlin 1960

Med.
1.2.61

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

2.4 Der Einfluß von Erythrozytenstromata auf die S-Hämolyse
2.5 Der Einfluß von Hämoglobin auf den Ablauf der S-Hämolyse
2.6 Der Einfluß von Glukose auf den Ablauf der S-Hämolyse
2.7 Die hämolytische Aktivität verschiedener Staphylolysine und der Einfluß der Lagerungstemperatur
Zusammenfassung der Befunde IV, 2
V. Besprechung der Ergebnisse
VI. Schlußbetrachtung
VII. Kurze Übersicht
Literatur

I. Einführung

Problematik und Aufgabe

Viele Arten von pathogenen Keimen enthalten oder produzieren Stoffe, die nicht nur toxikologisch oder immunologisch interessant sind, sondern auch über eine Reihe von verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften verfügen. Die Ergebnisse einer über ein Jahrzehnt dauernden Forschung mit Bakterientoxinen legte H. Raškova 1958 in einer Monographie vor. Dieses Buch „Über die Pharmakologie einiger Toxine" ist Rückblick und Perspektive zugleich für eine systematische Erforschung pharmakologischer Eigenschaften von Toxinen. Raškova und ihre Mitarbeiter widmeten Arbeit und Aufmerksamkeit der Pharmakologie von Shigella-Shigae-Toxin, Salmonella-Typhi-Endotoxin und Streptolysin O. Es ist zu erkennen, wie schon van Heyningen (1950) formulierte, daß die bisher untersuchten Toxine über spezifische pharmakologische Eigenschaften verfügen. Daran anknüpfend haben wir es im Verlaufe eines längeren Studienaufenthaltes im Laboratorium der tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften (Dir.: Prof. Dr. H. Raškova) übernommen, die Pharmakologie eines weiteren Toxins, des Staphylokokkentoxins (Staphylolysin), zu untersuchen. Wir mußten feststellen, daß pharmakologische Wirkungen über Staphylokokkentoxin auf den Organismus nur selten Gegenstand der Untersuchung gewesen sind. Damit aber waren wir mitten in der Geschichte des Toxins, dessen Problematik zu studieren uns um so lohnender erschien, je mehr wir diese kennenlernten.

Gegen Ende des vorigen Jahrhunderts wurde bekannt, daß Staphylokokken im Verlauf ihrer Entwicklung ein Toxin produzieren, das Gewebe und Zellen schädigen kann, sogar tödlich auf den Organismus wirkt (Übersicht bei Schmidt, 1940 und d'Antona, 1958). Eine eingehende Erforschung dieser Charakteristika begann aber erst um 1930 nach dem Unglück von Bundaberg. Eine Anzahl von Kindern starb innerhalb weniger Stunden mit den akuten Anzeichen einer Toxämie nach einer prophylaktischen Routineschutzimpfung gegen Diphtherie. Diese war durch Staphylococcus aureus zufällig hervorgerufen (Literatur siehe bei v. Heyningen, 1950). Die letale hämolytische und dermonekrotische Fähigkeit schrieb man zu dieser Zeit dem bis dahin bekannten α-Toxin zu. Erst im Verlaufe der folgenden Jahrzehnte wurde noch eine Reihe anderer Toxine gefunden. Die Toxine bezeichnet man auch als Hämolysine.

Das α-Toxin ist nicht nur das bekannteste, sondern vor allem auch das wichtigste aller Komponenten des Staphylokokkentoxins. Kaninchen und Mäuse werden durch dieses Toxin getötet.

Das β-Toxin ist für Kaninchen letal, nicht dagegen für Mäuse. Neben seiner hämolytischen Fähigkeit ist es erythembildend, zeigt aber keine Dermonekrose.

Das γ-Toxin zeigt sich ebenfalls nicht letal gegen Mäuse, dafür aber wie α-Toxin gegen Kaninchen. Es hämolysiert Erythrozyten verschiedener Spezies in bestimmter Reihenfolge.

Außerdem werden noch ein δ- und ε-Toxin unterschieden.

Neben diesen Toxinen stellen die Staphylokokken noch spezifisch wirkende Stoffe her, die der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen. Es sind dies das Leukozidin, das besonders polymorphkernige Leukozyten zerstört, und das Enterotoxin, das eine wichtige Rolle bei Nahrungsmittelvergiftungen spielen kann. Weiter werden einige Fermente, wie Koagulase (auch Staphylokinase genannt, die Plasminogen in Plasmin umwandelt), Fibrinolysin, Hyaluronidase, Lipase und Protease, zur Charakterisierung des Staphylokokkentoxins in der Literatur angegeben (v. Heyningen, Schmidt). Diese Art von einfachen Multienzymsystemen, denen Merkmale des Lebens zukommen, findet man bei den am wenigsten entwickelten Mikroorganismen, wie den Bakterien (Sexton, 1952).

Über die chemische Struktur von Staphylokokkentoxin und seine Komponenten ist bisher wenig bekannt geworden, obgleich Bemühungen in dieser Richtung unternommen wurden (Wittler und Pillemer, 1948, Butler, 1959). Das allgemeine Verhalten des α-Toxins läßt ein Protein von hohem Molekulargewicht vermuten (v. Heyningen). Man stellt sich vor, daß dieses Molekül verschiedene aktive Zentren für die entsprechenden Wirkungen hat.

Chemisch ist dieses Toxin also nicht definiert, dafür aber biologisch durch seine Antitoxine. Daneben kommen dem Staphylokokkentoxin andere Eigenschaften zu, durch die es sich qualitativ und zum Teil auch quantitativ charakterisieren läßt. Da Struktur und Wirkung sich gegenseitig bedingen, wird versucht, durch Erforschung der Vielzahl der Wirkungen die Struktur zu erschließen. Soweit es sich um die letalen, dermonekrotischen und hämolytischen Fähigkeiten des Staphylokokkentoxins handelt, ist hier schon — insbesondere von Mikrobiologen — viel Arbeit geleistet worden, wenn auch die Art der Wirkung, d. h. der Wirkungsmechanismus, unbekannt geblieben ist.

Der Beitrag von pharmakologischer Seite für spezielle Wirkungen dieses Toxins ist mehr als spärlich. Als erste berichteten Feldberg und Mitarbeiter (1937, 1938) über die Wirkung von Staphylokokkentoxin auf das isolierte Meerschweinchen-Ileum. Wirkungen am Kaninchendarm beschrieben Richmond, Reed, Shaugnessy und Michael (1942). Anderson, James und Marks sowie Kelsey und Hobbs berichteten zu gleicher Zeit (1954) ebenfalls über Wirkungen am Kaninchendarm. Am Meerschweinchen-Ileum führten auch Dworetzky, Baldwin und Smart (1956), ohne die eben angeführten

Arbeiten zu zitieren, Versuche durch. Nachdem wir schon mehrere Monate unsere Versuche an isolierten Organen durchgeführt hatten, erschien im Juni 1959 eine Arbeit von Brown, Prichard und Quilliam über „Einige pharmakologische Eigenschaften des α-Toxins von Staphylococcus pyogenes". Diese Arbeit stellt sozusagen eine Zusammenfassung der bisher bekannten Wirkungen des Staphylokokkentoxins am Kaninchen- und Meerschweinchendarm dar. Gleichzeitig wird versucht, den Einfluß verschiedener Pharmaka auf diese Reaktionen zu prüfen.

Wie man sieht, ist die pharmakologische Untersuchung von Staphylokokkentoxin nicht viel über diese beiden isolierten Organe hinausgekommen. Wir stellten uns daher im März 1959 die Aufgabe, an einer großen Reihe anderer isolierter Organe den Einfluß von Staphylokokkentoxin zu studieren. Uns interessierte die Wirkung des Toxins auf den isolierten Zellverband, das isolierte Organ, darüber hinaus war aber auch die Einwirkung auf isolierte Zellen, d. h. Erythrozyten, Gegenstand unserer Forschungen. Weiter wandten wir einigen Bedingungen der letalen Wirkung von Staphylokokkentoxin unsere Aufmerksamkeit zu.

II. Material

1. Staphylokokkentoxin, Herstellung und Chargen

Für unsere Versuche benutzten wir 2 Chargen Staphylolysin (S_I und S_{II}). (Dieses Toxin hatte in dankenswerter Weise Frau Dr. Součkova, Institut für Sera und Vakzine, Prag XII, hergestellt und uns übergeben.) Die beiden Chargen S_I und S_{II} waren keimfreie Filtrate von Kulturen von Staphylococcus pyogenes var. aureus, Wood 46.

Die Herstellung des Filtrates wird in folgender Weise vorgenommen: Bakterienstämme werden auf einer mit Zellophan bedeckten Agarplatte kultiviert (dieser Herstellungsprozeß wurde von Jacobsthal angeregt und von Birch-Hirschfeld 1933 eingehend beschrieben). Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß der auf dem Agar wachsende Bakterienrasen durch eine für Kolloide undurchlässige Membran aus Zellophan vom Nährboden getrennt ist. Da genügend leicht diffusibles Nährmaterial zur Verfügung steht, kann ein Bakterienwachstum stattfinden. Die von den Bakterien produzierten kolloidalen Stoffe sammeln sich auf der Zellophanhaut an. Die Flüssigkeit, zunächst noch Extrakt, ist charakterisiert durch einen hohen Eiweißgehalt und ein pH von 7,4 bis 7,8. Es lassen sich auf diese Weise stark wirksame, d. h. letal und hämolytisch wirksame Extrakte in 24 Stunden gewinnen.

Diese Extrakte wurden zentrifugiert und zur Entfernung der Zellreste keimfrei filtriert, dann ampulliert und uns übergeben.

Auch einige Ampullen mit Kulturmedium wurden uns für Vergleichsuntersuchungen überlassen. In der Zeit von März bis Anfang Juni 1959 wurden die Experimente mit S_I durchgeführt. Vom 1. Juni 1959 bis zum Februar 1960 verwandten wir für unsere Untersuchungen S_{II}. Für einige wenige Versuche konnten wir diese Charge vergleichen mit einem Produkt gleicher Herkunft und Herstellung, das nach der Filtrierung lyophilisiert war. Vom Hersteller war S_I und S_{II} in seiner hämolytischen Eigenschaft geprüft und gekennzeichnet:

	S_I	S_{II}
DHM α	5120	5120
DHM β	160–320	2560
LH α	270	264
pH	7,5	7,82

DHM α ist die Dosis haemolytica minima, die subjektiv, durch Ablesung bestimmt, die Verdünnung des Filtrates angibt, die eine 1%ige Kaninchenerythrozytensuspension unter definierten Zeit- und Temperaturbedingungen noch vollständig lysiert. Der Lysintiter ist der reziproke Wert der kleinsten Dosis. Bei Bestimmung des DHM β werden Hammelerythrozyten lysiert (Hotcold-lysis). Unter LH α verstehen wir die Menge Toxin, die nach Verbindung mit einer Antitoxineinheit noch eine 1%ige Kaninchenerythrozytensuspension lysiert.

Die Menge des lyophilisierten Präparates hatte im Durchschnitt ein Gewicht von 0,028 g/Amp. und wurde vor Gebrauch in 1 ml Aq. dest. gelöst. Durch chromatographische Bestimmung des Ampulleninhaltes auf Phospholipoide konnten etwa 2 μg Lecithin je mg Trockensubstanz gefunden werden. Ein weiterer Stoff der Anfärbung und dem R f-Wert entsprechend wird als Lysocephalin vermutet. Phospholipoide liegen in noch weit geringerer Menge vor. Der Nachweis von Phospholipase A und C war negativ.[1]

Alle Mengenangaben des Toxins sind, wenn nicht besonders vermerkt, Endkonzentrationen in ml/ml Badvolumen.

2. Substanzen

Acetylcholinhydrochlorid —*A*— (VEB Berlin Chemie),
Serotonin —*Se*— 5-Oxytryptamin-Kreatininsulfat (Roche, Basel),
Histamindihydrochloricum —*H*— (Merck, Darmstadt),
Adrenalinum chloratum solutum —*Ad*— (SPOFA, Prag),
Atropin sulfuricum —*Atr.*— (VEB AWD-Dresden),
Lysergsäurediäthylamidtartrat —*LSD*— (Sandoz, Nürnberg),
Lysergamid —*LSD*— (VUFB, Institut für Biochemie und Pharmazie, Prag),
Cepentyl —*C*— Maleinsaures Cyclopentylamid der d-Lysergsäure (VUFB, Institut für Biochemie und Pharmazie, Prag),
Reserpin —*R*— 3.4.5-Trimethoxybenzoesäureester des Methylreserpats (C. F. Boehringer und Söhne, Mannheim),
Propaphenin —*Cl*— N-(Dimethylamino)-propyl-chlorphenothiazin-hydrochlorid (VEB Deutsches Hydrierwerk, Rodleben),
Prostigmin —*Eu.*— Dimethylkarbaminsäureester des m-Oxyphenyltrimethylammoniumbromids (VEB Chemische Werke, Radebeul)
wurden verwandt.

Die Mengenangaben sind, wenn nicht besonders vermerkt, in der Konzentration des Salzes in g/ml angegeben.

Die Herstellung der physiologischen Lösungen wurde mit analysenreinen Substanzen vorgenommen.

[1] Fräulein A. Steinicke, Pharmakologisches Institut der Humboldt-Universität, hat diese Bestimmungen freundlicherweise für uns durchgeführt.

3. Tiere

An Tieren benutzten wir einheitliches Material an Mäusen, Ratten und Meerschweinchen von den Tierfarmen Bioveta und Konarovice. Kaninchen und Hühner waren ebenfalls aus der Farm Bioveta. Schnecken wurden uns von einer Tierzucht-Genossenschaft geliefert.

4. Zur Nomenklatur

Das Toxin von Staphylococcus pyogenes var. aureus wird in seiner Gesamtheit als Staphylokokkentoxin, Staphylolysin oder Staphylotoxin synonym bezeichnet. Die einzelnen Bestandteile des Toxins α, β, γ usw. werden entweder α-Toxin, β-Toxin oder α-Hämolysin, β-Hämolysin oder α-Lysin, β-Lysin usw. genannt.

Das von uns benutzte Staphylokokkentoxin (abgekürzt: S) wurde ausschließlich vom Stamm Wood 46 gewonnen. Dieser Stamm wird zur Toxinherstellung allgemein wegen seines sehr hohen toxigenen Vermögens (Schmidt, d'Antona) insbesondere als α-Toxinbildner gern benutzt.

III. Die Wirkung von Staphylolysin (S) an isolierten Organen

1. Die Wirkung von Staphylolysin auf Abschnitte des Verdauungstraktes

Einleitung und allgemeine Methodik

Alle bisher bekannten pharmakologischen Wirkungen von S sind das Ergebnis von Untersuchungen verschiedener Forscher (Feldberg, Dworetzky, Hobbs, Quilliam u. a.) an Ileum und Jejunum des Meerschweinchens sowie an Jejunum und Duodenum des Kaninchens. Für uns war es zunächst von Interesse festzustellen, ob andere Abschnitte des Verdauungstraktes in ähnlicher Weise auf S reagieren würden und ob die von anderen Untersuchern angegebenen Befunde sich auch an unserem Tiermaterial reproduzieren ließen. Letzteres war darum wichtig, weil wir durch unsere Experimente die von anderen Autoren und uns erhobenen Befunde, zumindest für die Wirkung von S am Verdauungstrakt, für glattmuskuläre Organe verallgemeinern konnten. Wir untersuchten isolierte Abschnitte des Magen- und Darmkanals von Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hühnern. Die Empfindlichkeit auf Standardtestsubstanzen wie Acetylcholin, Histamin und Serotonin bei den einzelnen Spezies ist sehr unterschiedlich und zeigt sich auch an den isolierten Organen dieser Tiere. So ist z. B. bekannt, daß Meerschweinchen sehr empfindlich auf Histamin (Bovet, 1950; Schöttler, 1954; Sparrow und Wilhelm, 1957) und Histaminliberatoren wie Compound 48/80 (Feinberg und Sternberger, 1955) reagieren im Gegensatz zu Mäusen (Kind, 1955; Papacostas, Loew und West, 1959). Ratten zeigen gegenüber Meerschweinchen und Kaninchen eine hohe Serotoninempfindlichkeit (Sparrow und Wilhelm, 1957).

Da es sich bei den nachfolgend geschilderten Versuchen nur um Experimente an isolierten Organen handelt, sei eine Darstellung der allgemeinen Methode vorangestellt. Abweichungen von der üblichen Methodik werden jeweils bei den einzelnen isolierten Organen besonders erwähnt.

Methodik

Die Wirkungen von Substanzen auf die glatte Muskulatur werden am einfachsten nach der Methode von Magnus am isolierten Muskel untersucht. Frisch getötete Tiere wurden laparatomiert, entsprechende Abschnitte des Magen-Darm-Kanals entnommen und in handwarme Nährlösung gelegt. Die physiologische Lösung zur Aufbewahrung und Säuberung der Organe war, da ihre Stabilität nur begrenzt ist, frisch hergestellt und hatte folgende Zusammensetzung (nach Tyrode):

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
0,2 g $CaCl_2$
0,1 g $MgCl_2$
1,0 g $NaHCO_3$
0,05 g NaH_2PO_4
1,0 g Glukose ad 1000 ml aq. dest.

Das pH dieser Lösung betrug 7,2—7,4. Nach Entfernung von Binde-, Fett- und Gefäßgewebe wurden 2—3 cm lange Organstücke geschnitten und diese in ein doppelwandiges mit Tyrode gefülltes Gefäß in der Weise aufgehängt, daß das untere Ende des Muskels fixiert und das obere Ende über einen Faden mit einem frontal schreibenden Hebel verbunden war. Die Longitudinalbewegungen des Organstückes wurden auf einen Rußkymographen in etwa 5facher Vergrößerung aufgezeichnet. Die Drehgeschwindigkeit des Kymographen war in allen Versuchen gleich und betrug 0,8 cm/min. Das Organband wurde mit einem mäßigen Strom von Sauerstoff und 5 % CO_2 durchperlt. Die Temperatur der Badflüssigkeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 37—38 °C. Im Gegensatz zu früheren Versuchen (1959 a) arbeiteten wir stets mit frischen Organen. Es wurden immer 2 Präparationen des gleichen Tieres zugleich in getrennten Gefäßen untersucht und an der gleichen Rußtrommel die Kontraktionen registriert. Dieses Vorgehen erwies sich als besonders geeignet, wenn „Antagonisten" angewandt wurden. Hierbei fungierte immer ein Teil des gleichen Organs bzw. ein Organ als Kontrolle.

Die Mengenangaben beziehen sich auf g/ml bzw. ml/ml Badflüssigkeit. Am Anfang jedes Versuches wurde die Empfindlichkeit der einzelnen Präparationen auf Standardtestsubstanzen geprüft. Dabei wurde darauf geachtet, daß Dosen angewandt wurden, bei denen die Reaktionen submaximal waren.

Weiterhin hielten wir folgende Bedingungen ein:

1. Vor Beginn des Versuches blieben die einzelnen Organe immer eine bestimmte Zeit (bis zu 60 min) in Ruhe.

2. Mit Durchführung des Versuches wurde die Applikation und Einwirkungsdauer der Substanzen, das Spülen und Ersetzen der Badflüssigkeit nach einem festgesetzten Schema und Rhythmus durchgeführt. (Dieser Rhythmus ist spezifisch für jedes Organ und muß durch Beobachtung festgestellt werden. Für die Reproduzierbarkeit der Befunde ist die Einhaltung der Intervalle für die gesamte Versuchsdauer wichtig).

3. Die Applikation der Substanzen und des Toxins wurde immer im gleichen Volumen vorgenommen und geschah mit Hilfe von Injektionsspritzen mit geboge-

ner Kanüle gleichzeitig in unmittelbare Nähe der Präparationen. Damit waren von vornherein bei den Reaktionen auftretende Latenzzeiten gut bestimmbar.

Die vorliegenden Befunde wurden auszugsweise publiziert bzw. vorgetragen (1959 b–d, 1960 a–b).

1.1 Wirkung von S auf das Ileum des Meerschweinchens

Den von uns mit S erhobenen Befunden am Meerschweinchen werden Ergebnisse, die bereits in der Literatur vorliegen, vorangestellt. Dabei finden Angaben Berücksichtigung, die am Darm von Meerschweinchen vornehmlich mit Filtraten von Staphylokokkenkulturen erhalten wurden. Die erste Mitteilung über die Wirkung von Staphylokokkentoxin auf den Meerschweinchendarm wurde 1938 von FELDBERG und KELLAWAY gemacht. Sie beobachteten nach Gaben von Staphylokokkentoxin, das nach der Methode von BURNET und FREEMANN präpariert war, eine stimulierende Wirkung auf das Meerschweinchen-Jejunum. Bei der ersten Gabe von Toxin entwickelte sich nach einer Latenzperiode von 13–30 s eine Kontraktion. Innerhalb von 6–7 min trat eine komplette Relaxation des Muskels ein. Weitere Gaben des Toxins hatten eine wesentlich geringere Wirkung. Auch die Empfindlichkeit auf Histamin war herabgesetzt. Größere Dosen von Toxin machten den Darm irreversibel unempfindlich auf Histamin und Toxin. Am Meerschweinchen-Ileum fanden einige Jahre später DWORETZKY und Mitarbeiter (1952, 1956) nach Applikation eines Staphylokokkenfiltrats von Wood 46 eine langsam sich entwickelnde Kontraktion, die mit kurzer Latenzzeit (< 1 min) auftrat. Wiederholter Wechsel der Badflüssigkeit nach Beginn der Tonuszunahme beeinflußte die Reaktion nicht. Vor Erreichen einer maximalen Kontraktur war die Histaminempfindlichkeit des Meerschweinchen-Ileums nicht eingeschränkt. Verblieb der Darm im Zustand der maximalen Kontraktur, wurde er irreversibel unempfindlich auf weitere Gaben von Filtrat bzw. Histamin. Die Anwendung kleinerer Mengen S führte zu schwächerer Tonuserhöhung bei erhaltener Empfindlichkeit auf Histamin. Diese Reaktion war reversibel und gut auswaschbar. Ähnliche Beobachtungen am Meerschweinchen-Ileum machten BROWN, PRICHARD und QUILLIAM (1959) mit lyophilisierten Filtraten von Staphylokokkenkulturen von hohem Molekulargewicht (Wellcome Research Laboratories). Ihre Befunde mit Staphylokokkentoxin am Meerschweinchen-Ileum sind charakterisiert durch:

a) eine Latenzperiode von 1–2 min Dauer zwischen Applikation des Toxins und dem Beginn der Kontraktion,
b) eine langsame Verstärkung der Kontraktion, die nach einigen Minuten ihr Maximum erreicht,
c) ein Bestehenbleiben der maximalen Kontraktur und
d) Unempfindlichkeit des Darmes auf weitere Gaben Toxin bzw. Testsubstanzen.

Diese Arbeit erregt noch aus einem anderen Grund unser Interesse. Es wurde der Versuch unternommen, durch Pharmaka die Toxinreaktion zu beeinflussen. Einige Substanzen waren in der Lage, die durch das Toxin hervorgerufene Kontraktion zu reduzieren, jedoch nur, wenn diese vor bzw. nach der Applikation des Toxins im Bad belassen wurden. Nach Spülung entwickelte sich jedoch die Kontraktion wieder. Papaverin war am wirksamsten, weniger Pethidin (Dolantin) und Mepyramin (Neoantergan). Atropin zeigte keine eindeutigen Effekte. Hexamethonium war ohne Einfluß auf die durch Staphylokokkentoxin ausgelöste Kontraktur.

Die Wirkung von S insbesondere am Meerschweinchendarm schien damit recht eindeutig, und wir hatten nun gewisse Vergleichsmöglichkeiten nicht nur über die Art des von uns verwandten S, sondern auch über seine pharmakologische Potenz.

Die folgenden Ergebnisse wurden aus 32 Versuchen gewonnen. Dünndarmsegmente aus dem Bereich der Ileocoecalklappe erschienen wegen hoher Acetylcholin- und Histaminempfindlichkeit geeignet. Diese waren etwa 400 g schweren Meerschweinchen beiderlei Geschlechts entnommen. Die Versuche führten wir in der Zeit vom 18. 5. bis 15. 7. 1959 mit S_I und S_{II} durch.

Allgemeine Bemerkungen zu den Abbildungen

Die Applikation der Pharmaka (g/ml) bzw. des Staphylokokkentoxins (S in ml/ml) wurde bei ↑ vorgenommen. Es bedeutet:

Ausschlag nach oben = Verkürzung der Longitudinalmuskulatur (Kontraktion bzw. Tonisierung).

Ausschlag nach unten = Verlängerung der Longitudinalmuskulatur (Spasmolyse).

Testsubstanzen, wie Acetylcholin (A), Serotonin (Se), Histamin (H) u. a., wurden bei laufendem Kymographen 1 min im Organbad belassen. Dann wurde der Kymograph angehalten und die Badflüssigkeit gewechselt.

P = Nichtregistrieren des Versuchs bei stehendem Kymographen für 20 min.

Die Abbildungen sind nur in Verbindung mit dem Text zu verstehen.

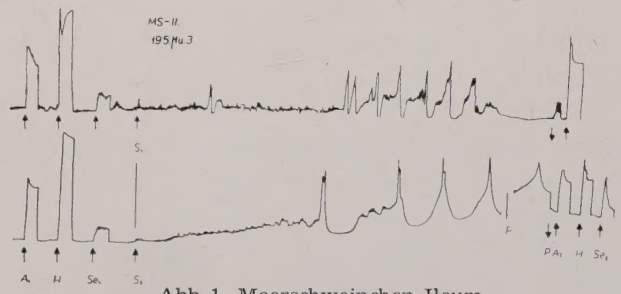


Abb. 1. Meerschweinchen-Ileum

A_1	10^{-8} g/ml	H	$2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml
A_2	$2 \cdot 10^{-8}$ g/ml	S_I	10^{-3} ml/ml
Se_1	$2 \cdot 10^{-8}$ g/ml	S_2	$2 \cdot 10^{-3}$ g/ml
Se_2	10^{-7} g/ml		

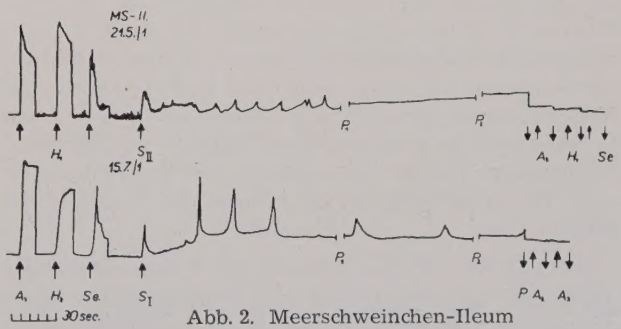


Abb. 2. Meerschweinchen-Ileum

A_1	10^{-8}	H_2	10^{-8}
A_2	$2 \cdot 10^{-8}$	S_I	10^{-2}
A_3	10^{-7}	S_{II}	10^{-2}
Se	$2 \cdot 10^{-8}$	P_1 = 7 min	
H_1	$2 \cdot 10^{-8}$	P_2 = 5 min	

Ergebnisse

Die S-Wirkung beginnt in den meisten Fällen ohne eine ausgesprochene Latenzzeit. Dabei kommt es zunächst zu einer Verstärkung der häufig ziemlich geringen Motorik des Meerschweinchen-Ileums. Läßt man das S genügend lange (bis zu 30 min) einwirken, dann findet man bei Dosen von 10^{-3} ml/ml S Kontraktionen in rhythmischer Folge. Diese Kontraktionen halten mehrere Minuten an. Nur selten beginnen Spontankontraktionen gleich nach Applikation des Toxins. Die Abbildung demonstriert die Dosisabhängigkeit der Wirkung (Abb. 1). Größere Mengen S führen neben den geschilderten Effekten zu mäßiger Tonuserhöhung. Nach 60 min Einwirkungszeit kann die S-Wirkung wieder ausgewaschen werden. Der Darm ist empfindlich auf Acetylcholin, Histamin und Serotonin wie zu Beginn des Versuchs. Nur sehr empfindliche Darmstücke, die auf S mit stärkerer Tonuserhöhung reagieren, verlieren ihre Empfindlichkeit (Abb. 2) auf Testsubstanzen. Regelmäßig findet sich eine Tonuserhöhung verschiedenen Grades bei Dosen über $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S, wie die Abbildung zeigt. Außerdem wird hier deutlich, daß zwischen S_I und S_{II} am Meerschweinchen-Ileum keine qualitativen Unterschiede in der Reaktionsweise bestehen.

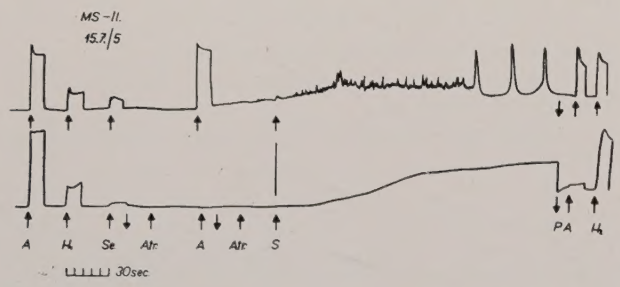


Abb. 3. Meerschweinchen-Ileum: Einfluß von Atropin (Atr.)

A	$2 \cdot 10^{-8}$	H_2	$4 \cdot 10^{-8}$
Se	$2 \cdot 10^{-8}$	Atr.	$5 \cdot 10^{-7}$
H_1	$2 \cdot 10^{-8}$	S	$5 \cdot 10^{-3}$

Einfluß von Lysergsäurediäthylamid und Atropin

Mit LSD, $2 \cdot 2 \cdot 10^{-6}$ g/ml[2], konnten wir die Wirkung von 10^{-7} g/ml Serotonin hemmen. Da aber LSD in dieser Dosierung am Meerschweinchen-Ileum ebenfalls zu einer reversiblen Kontraktion (Picarelli, 1956) führt, war eine antagonistische Wirkung zu S nicht eindeutig nachzuweisen. Atropin ließ mit $2 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$ g/ml die Tonuserhöhung unbeeinflußt, unterdrückte die durch $5 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S ausgelöste Motilität und die Spontankontraktion jedoch völlig (Abb. 3). Die Empfindlichkeit auf Histamin bleibt bis zum Ende des Versuchs erhalten.

Ordnen wir unsere Befunde am Meerschweinchen-Ileum, so sehen wir nach S eine dosisabhängige Reaktion, die sich äußert:

a) in einer Verstärkung der Motilität. Diese setzt bei fast allen Versuchen nach einer kurzen Latenzzeit ein. Weiter gehört dazu

b) das Auftreten von Spontankontraktionen in rhythmischer Folge innerhalb von 30 min nach S-Applikation. Nach höheren Dosen kommt es meist dann

c) zur Verkürzung des Darmmuskels, d. h. zu einer Erhöhung des Tonus,

d) zum Verlust der Empfindlichkeit des Organs auf S bzw. Acetylcholin und Histamin nach S-Dosen über $5 \cdot 10^{-3}$ ml/ml.

e) Atropin hemmt partiell die S-Reaktion.

1.2 Wirkung von S auf das Ileum der Ratte

Die folgenden Befunde wurden in 30 Versuchen erhalten. Das Ileum reagiert gut auf Acetylcholin, schwächer auf Serotonin, für Histamin ist es sehr wenig empfindlich. Wir verwandten 200—250 g schwere Ratten beiderlei Geschlechts, vorwiegend weibliche Tiere. Die Versuche wurden in der Zeit vom 25. 8. bis 3. 9. 1959 ausschließlich mit S_{II} durchgeführt.

Ergebnisse

Die Dosisabhängigkeit von S tritt auf der Abbildung gut in Erscheinung (Abb. 4). Darmstücke mit etwa gleicher Acetylcholinempfindlichkeit bei steigender S-Konzentration sind hier vergleichend zusammengestellt. Die Reaktion beginnt, wenn man von einer geringen initialen Kontraktion nach Applikation von S absieht, in Form einer langsam sich verstärkenden Kontraktion, die bei Dosen bis zu $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S je nach Empfindlichkeit des Organs nur selten maximal wird. Erst höhere S-Dosen (10^{-2} ml/ml) führen nach kurzer Latenz zu einer Erhöhung des Tonus, bis eine maximale

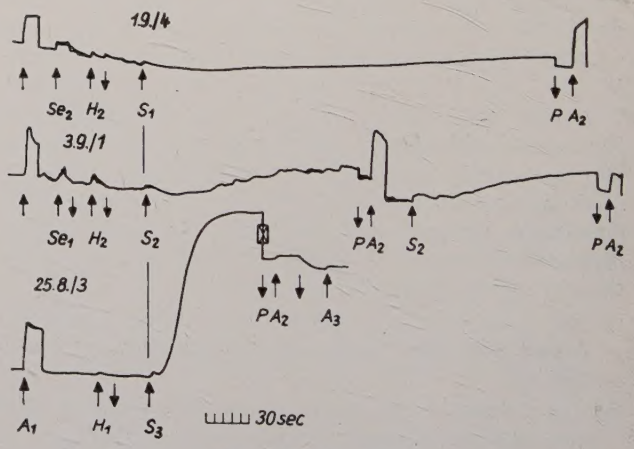


Abb. 4. Ratten-Ileum

A_1	$2 \cdot 10^{-8}$	H_1	$4 \cdot 10^{-8}$
A_2	$4 \cdot 10^{-8}$	H_2	$2 \cdot 10^{-7}$
A_3	10^{-7}	S_1	10^{-3}
Se_1	$2 \cdot 10^{-8}$	S_2	$2 \cdot 10^{-3}$
Se_2	$4 \cdot 10^{-8}$	S_3	10^{-2}

⊠ = künstliche Relaxation (mit Gewicht)

Kontraktur erreicht ist. Während nach Dosen unter 10^{-2} ml/ml die Organe auf Acetylcholin allgemein noch normal reagieren, ist die Reaktivität nach höheren

[2] $2 \cdot 2 \cdot 10^{-6}$ bedeutet, daß 2mal im Verlaufe des Versuchs die Menge $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml appliziert wurde. Alle folgenden Angaben sind entsprechend zu lesen.

S-Gaben deutlich eingeschränkt. Auf dieser Abbildung sehen wir außerdem, daß nur relativ geringe Dosen S ($2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml) auswaschbar sind bei erhaltener Acetylcholinempfindlichkeit. Erst die nachfolgende S-Reaktion führt zu einer stärkeren Reduzierung der Suszeptibilität.

Einfluß von LSD und Atropin

In 10 Versuchen sahen wir nach $2 \cdot 5 \cdot 10^{-7}$ g/ml Atropin keine Veränderung der S-Wirkung (Abb. 5). Auch LSD $2 \cdot 2 \cdot 10^{-6}$ g/ml konnte die S-Reaktion nicht verändern (Abb. 6).

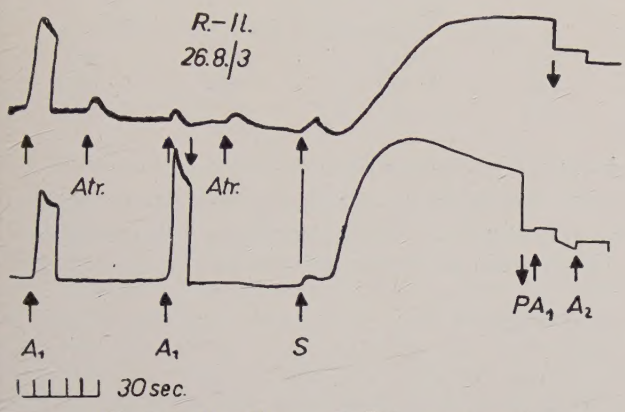


Abb. 5. Ratten-Ileum: Einfluß von Atropin

A_1	10^{-7}	Atr.	$5 \cdot 10^{-7}$
A_2	10^{-6}	S	$5 \cdot 10^{-3}$

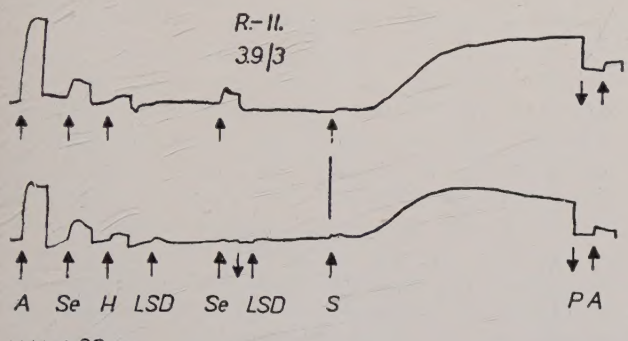


Abb. 6. Ratten-Ileum: Einfluß von LSD

A	10^{-7}	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$
Se	$2 \cdot 10^{-7}$	S	$5 \cdot 10^{-3}$
H	$2 \cdot 10^{-7}$		

Zusammenfassend finden wir also am Ratten-Ileum:

a) eine dosisabhängige S-Reaktion. Mit steigender S-Konzentration wird die Latenzzeit kürzer, die Wirkung intensiver.

b) Hohe S-Dosen führen zu maximaler Kontraktur und machen den Darm unempfindlich für weitere Gaben von Toxin.

c) Die S-Reaktion ist bis zu einem gewissen Grade dosisabhängig-reversibel und auswaschbar.

d) Die S-Wirkung ist Atropin- und LSD-resistent.

Vergleichen wir diese Befunde mit den von QUILLIAM und Mitarbeitern, so können wir sagen, daß unsere Beobachtungen am Ratten-Ileum den ihren am Meerschweinchen-Ileum nahezu entsprechen. Auf S reagiert das Ratten-Ileum immer regelmäßig prompt und intensiv. Am Ratten-Ileum war immer die Zunahme des Tonus das Charakteristische, am Meerschweinchen-Ileum die Verstärkung der Motilität.

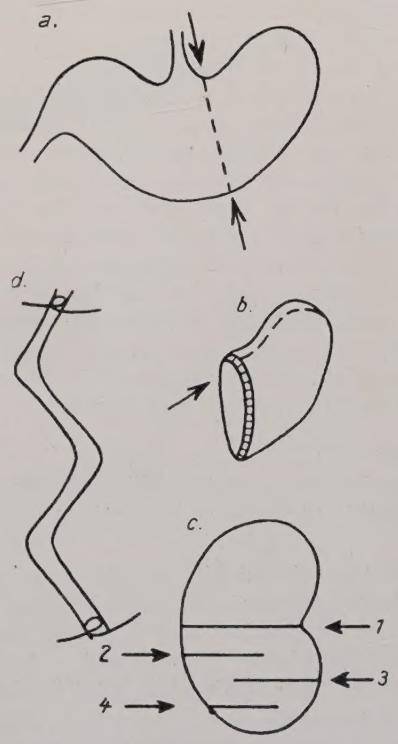
Wir prüften nun, ob auch andere Teile des Verdauungsapparates der Ratte in gleicher Weise auf S reagieren würden.

1.3 Wirkung von S auf den Magenstreifen der Ratte (mit Methodik)

Um die Wirkung von S auf den isolierten Magenstreifen der Ratte zu prüfen, führten wir 44 Versuche in der Zeit vom 14. 4. bis 30. 4. 1959 durch. Für die Versuche wurde S_I verwandt. Männliche und weibliche Ratten von mindestens 300 g Gewicht waren gut geeignet. Die von uns benutzte Methode wurde von VANE (1957) angegeben. Unsere Aufgabenstellung machte eine Modifizierung der Methode notwendig. Aus diesem Grunde erscheint eine Beschreibung erforderlich.

Methodik (siehe Abb.)

Ratten wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Pars membranacea vom Magen (a) abgetrennt, aufgeschnitten (b) und aufgeklappt (c). Der Mageninhalt wurde durch Spülen mit physiologischer Lösung entfernt. Sodann wurde die Pars membranacea geteilt (c_1) und in 2–3 mm breite Streifen geschnitten ($c_{2,3,4}$). Die 2–3 cm langen Magenstreifen (d) wurden in separaten Gefäßen wie üblich aufgehängt und mit einem Hebel verbunden.



VANE schnitt aus einem Magenpräparat immer nur einen Streifen und fixierte diesen in einem 15 cm hohen Bad. Infolgedessen erhielt er bei seinen Präparationen eine höhere Serotoninempfindlichkeit als wir. Unsere Präparationen vom gleichen Organ waren aber für vergleichende Untersuchungen besser geeignet.

Obgleich die Magenstreifen sich oft noch nach den ersten Testgaben etwas dehnen, sind sie mehrere Stunden reagibel. Neben Serotonin ist die Empfindlichkeit der Präparation auf Acetylcholin sehr hoch. Auf Histamin reagieren Magenstreifen nur in hohen Konzentrationen.

Ergebnisse

Bei der Anwendung von S kommt es am Magenstreifen nach einer Latenz von einigen Sekunden schon bei Gaben von 10^{-3} ml/ml zu einer starken Verkürzung des Muskelstreifens. Bei den kleineren Dosen geht diese Tonuserhöhung in einzelnen Etappen vor sich (Abb. 7), während bei größeren Dosen, wie in den an-

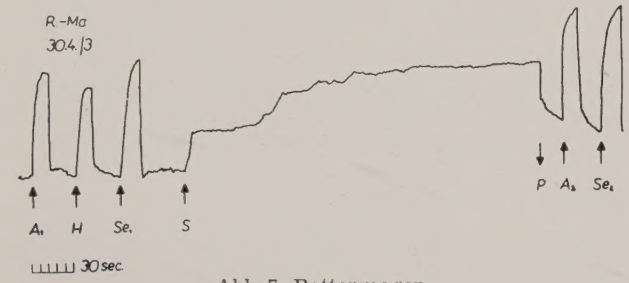


Abb. 7. Rattenmagen

A_1	10^{-8}	Se_2	$4 \cdot 10^{-7}$
A_2	$4 \cdot 10^{-7}$	H	10^{-5}
Se_1	$2 \cdot 10^{-7}$	S	10^{-3}

deren Abbildungen (8 und 9) deutlich wird, sich der Anstieg des Tonus mehr konstant verändert. Man kann leicht feststellen, daß die Reaktion auch bei quantitativ unterschiedlichen S-Mengen qualitativ in der gleichen Weise abläuft. Ein Magenstreifen, sofern er auf S empfindlich ist, reagiert immer heftig intensiv. Man findet also in gewissem Sinne eine dosisunabhängige Reaktion. Nicht immer wird ein Kontrakturmaximum erreicht, und die Tonuszunahme bleibt submaximal. Neben der langsamen Tonisierung können auch kleine peristaltische Wellen beobachtet werden. Die Dosis/Wirkungsbeziehungen in diesen Versuchen zeigen sich lediglich in der erhaltenen Empfindlichkeit auf S und auf Testsubstanzen nach kleinen Dosen S (Abb. 7), während nach größeren S-Gaben die Reaktion auf Testsubstanzen nur noch schwach bzw. aufgehoben ist. Eine Relaxation auf das ursprüngliche Niveau wurde auch nach heftigem Spülen nicht gesehen.

Einfluß von LSD

Die hohe Serotoninempfindlichkeit des Organs ließ es angebracht erscheinen, Serotoninantagonisten zu prüfen.

Dabei mußten wir zunächst die Feststellung machen, daß am Magenstreifen ziemlich regelmäßig $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml LSD zu einer reversiblen auswaschbaren Kontraktion führt. Diese Tatsache ist bekannt und in der Literatur von Medakovic und Radmanovik (1958) beschrieben.

In der Abbildung (8) ist die LSD-Kontraktion schwach angedeutet. Da das Verbleiben von LSD jedoch für mindestens 90 min angegeben wird, also in dieser Zeit ein völliges Auswaschen nicht möglich ist, führten wir Versuche mit S unter LSD durch. Unter LSD kommt es manchmal zu einer schwächeren Tonisierung nach Gabe von S. Eine völlige Unterdrückung der Kontraktur auch bei Applikation kleinerer Mengen S konnte aber nicht erreicht werden. Nach Ablauf der S-Reaktion war die Reaktivität des Magenstreifens auf Acetylcholin stark reduziert.

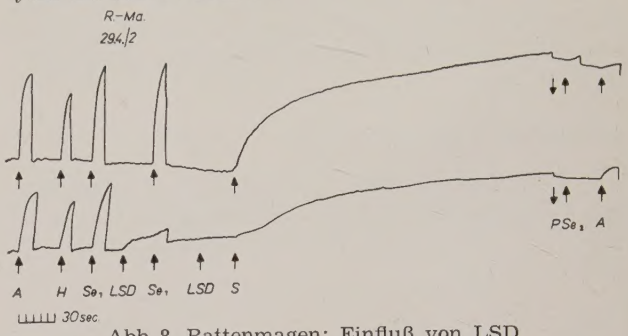


Abb. 8. Rattenmagen: Einfluß von LSD

A	10^{-6}	H	10^{-5}
Se_1	$4 \cdot 10^{-7}$	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$
Se_2	10^{-6}	S	$2 \cdot 10^{-3}$

Vergleich von S_I und S_{II}

Zur Vervollständigung unserer Befunde am Magenstreifen haben wir die beiden Chargen S_I und S_{II} verglichen (Abb. 9). Wenn man von der unterschiedlichen

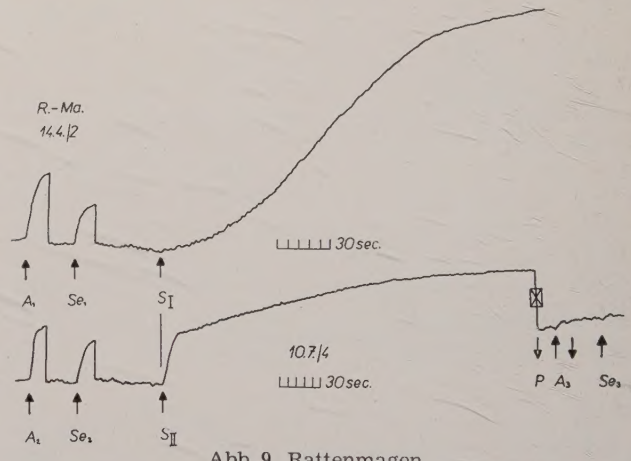


Abb. 9. Rattenmagen

A_1	$4 \cdot 10^{-8}$	Se_2	$2 \cdot 10^{-7}$
A_2	$2 \cdot 10^{-7}$	Se_3	10^{-6}
A_3	$4 \cdot 10^{-7}$	S_I	10^{-2}
Se_1	$8 \cdot 10^{-8}$	S_{II}	10^{-2}

⊠ = künstliche Relaxation

Empfindlichkeit der beiden Präparationen absieht (siehe Testdosen), kommt es zu qualitativ ähnlichen Reaktionen.

Der empfindlichen Reaktionsweise am Magenstreifen auf S sollen kurz Befunde beigefügt werden, die wir am Duodenum der Ratte erhielten.

1.4 Wirkung von S auf das Duodenum der Ratte

Das Ratten-Duodenum zeigt sich ebenfalls sensitiv auf S (Abb. 10). Nach der geringen Anfangskontraktion setzt eine langsame Tonuserhöhung ein, die submaximal bleibt. Die Empfindlichkeit auf Acetylcholin und Serotonin ist in unseren Versuchen nicht sehr hoch.

Bevor wir unsere Ergebnisse an anderen Abschnitten des Verdauungstraktes der Ratte schildern, bringen wir zum Vergleich die Befunde am Duodenum des Kaninchens.

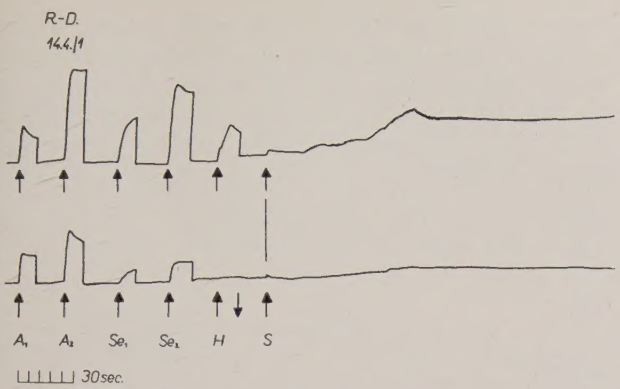


Abb. 10. Ratten-Duodenum

A_1	$2 \cdot 10^{-7}$	Se_2	10^{-6}
A_2	10^{-6}	H	10^{-5}
Se_1	$2 \cdot 10^{-7}$	S	$2 \cdot 10^{-3}$

1.5 Wirkung von S auf das Duodenum von Kaninchen

Dieses Organ war gelegentlich für pharmakologische Untersuchungen von Staphylokokkentoxin angewandt worden. Die Fähigkeit einiger Staphylokokkenstämme, eine enterotoxische Substanz zu bilden, veranlaßte 1942 Richmond und Mitarbeiter, Toxin von Staphylokokken am isolierten Darm von Kaninchen zu untersuchen. Die Autoren waren bemüht, einen Test zu erarbeiten, der als Indikator für enterotoxin-produzierende Staphylokokkenstämme Verwendung finden sollte. Der von Dolman, Wilson und Cockroft (1936), später auch von Bayliss (1940) angegebene „Kittentest“[3] wurde ganz im Gegensatz zu Kupchick (1937) wegen der individuellen sehr unterschiedlichen Reaktionsweise der jungen Katzen auf Staphylokokkenenterotoxin und seiner oft subjektiven Bewertung nicht als ideal angesehen. An Jejunum und Duodenum von Kaninchen erhielten Richmond und Mitarbeiter nach Verabreichung ihres Toxins eine Steigerung der Motilität und des Tonus. Im Jahre 1954 bestätigten zu gleicher Zeit zwei englische Forscher, Anderson und Mitarbeiter sowie Hobbs und Mitarbeiter, daß die Wirkung auf den Kaninchendarm nicht spezifisch für Enterotoxin ist. Vielmehr sind sie der Meinung, daß die Darmwirkung von Staphylokokkentoxin auf einem verstärkten α-Toxingehalt beruht, der gerade bei nahrungsmittelvergiftenden Staphylokokkenstämmen besonders stark ist. Obgleich die Untersucher mit Toxin verschiedener Herstellung arbeiten, kommen sie zu recht übereinstimmenden Ergebnissen. α- und β-Toxin setzen die Spontanmotilität an Duodenum und Jejunum von Kaninchen herab, wobei α-Toxin nach einer Latenz von mehreren Sekunden bis Minuten zu einer verstärkten Tonisierung führt, β-Toxin dagegen den Tonus herabsetzt. Hobbs und Mitarbeiter arbeiteten mit Filtraten u. a. von Wood 46 und erhielten mit den α-lytischen Fraktionen stärkste Effekte am Darm. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang erscheinen uns bei diesen Autoren die Wirkungen von 30 min gekochten Staphylokokkenfiltraten am Kaninchendarm. Diese Effekte konnten nicht durch α- oder β-Antitoxin neutralisiert werden, ebenfalls auch nicht durch Gaben von $4 \cdot 10^{-6}$ g/ml Atropin. Da diese Wirkungen nicht regelmäßig zu erzielen waren, sind Kelsay und Hobbs der Meinung, daß es sich um unspezifische Stimulationen durch das Filtrat handelt; da dieser Effekt nicht α- und β-Antitoxin-empfindlich ist, führen die Autoren ihn auf das im Nährboden enthaltene Pepton zurück. Daß bei diesen Beobachtungen das Enterotoxin doch eine Rolle spielen muß, geht unserer Meinung nach aus späteren Befunden von Sédlak und Průchová (1958) hervor. Auf die Arbeit von Kelsay und Hobbs gehen diese Autoren leider nicht ein, sondern kommen zu der Feststellung, daß die erhitzten enterotoxischen Filtrate typische Kontraktionen am Kaninchen-, Meerschweinchen- und Rattendarm hervorrufen. Am

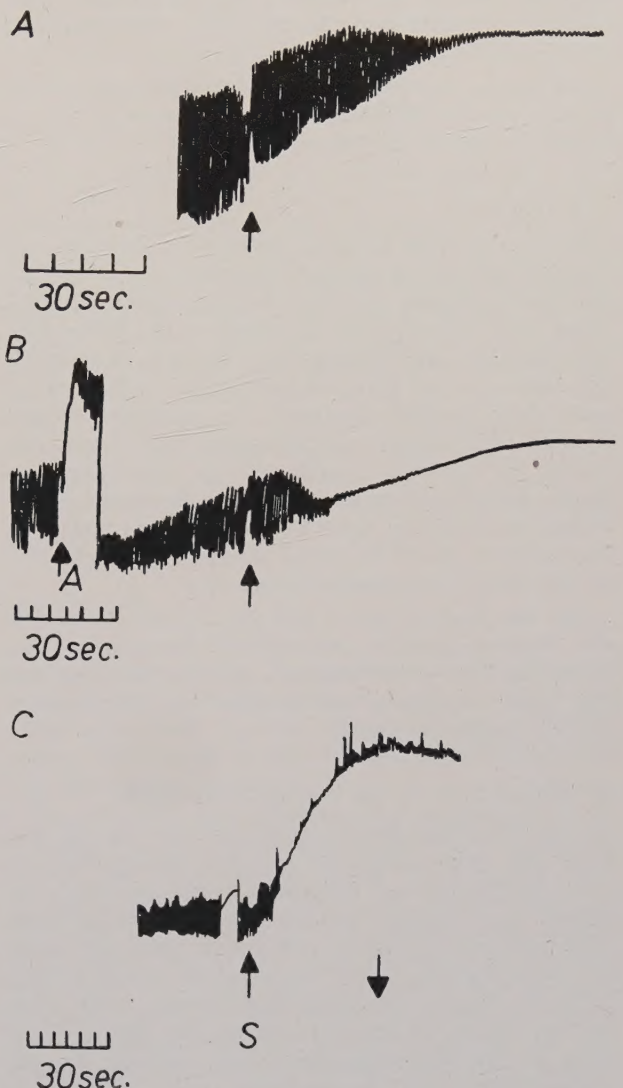


Abb. 11. Kaninchendarm: Wirkung von S (α-Lysin)

A Kaninchen-Duodenum
10 HU (haemolctic units)/ml Bad
nach Anderson, James und Marks

B Kaninchen-Duodenum
S $3 \cdot 10^{-3}$/ml A $2 \cdot 10^{-8}$

C Kaninchen-Jejunum
10 HU/ml
nach Brown, Prichard und Quilliam

[3] Um bei Staphylokokken die Bildung enterotoxischer Substanzen nachzuweisen, werden jungen Katzen aufgekochte Staphylokokkenkulturfiltrate intraperitoneal verabfolgt. Enthalten diese Filtrate Enterotoxin, so reagieren die Katzen meist mit Erbrechen.

empfindlichsten und ihrer Meinung nach spezifisch reagiert das Ratten-Duodenum.

Wir haben die Beziehungen zum Enterotoxin ausführlicher dargestellt, um unsere Versuche gegen die eben erwähnten schon jetzt abzugrenzen, da unser Filtrat keine biologisch feststellbaren Mengen an Enterotoxin enthielt.

Die schon zitierte Arbeit von Brown, Prichard und Quilliam, die den Einfluß verschiedener Pharmaka auf die Wirkungen von α-Toxin auch am Kaninchen-Jejunum studieren, muß hier Erwähnung finden. Die Autoren finden eine Hemmung des S-Effektes durch Papaverin und Pethidin, etwas schwächer antagonistisch war Mepyramin, Amylnitrit und Aminophyllin.

Unsere Versuche hatten das Ziel festzustellen, ob auch das von uns verwandte S auf Grund der in der Literatur angegebenen Daten sich wirkungsmäßig ähnlich verhielt.

Die Organe wurden vor Beginn der Versuche 30 min im temperierten Gefäß belassen. Die Versuche führten wir am 6. und 7. 10. 1959 durch.

Ergebnisse

Die von anderen Autoren geschilderte Wirkung von S findet sich auch in unseren Versuchen (Abb. 11). Vergleichsweise haben wir die entsprechenden Kurvenbilder von Anderson und Mitarbeitern (A) sowie auch von Quilliam und Mitarbeitern (C) danebengestellt. Bei Anderson und Quilliam beginnt die Toxinwirkung nach einer kurzen Latenzzeit, bei unserem Versuch $3 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S dauert die Latenzzeit etwa 1 min. Die Stärke der S-Wirkung zeigt sich am Kaninchendarm in der schnellen Unterdrückung der Spontankontraktionen, im Erreichen eines Tonusmaximums und eines irreversiblen Spasmus. Ohne spontan zu erschlaffen, ist der Darm unempfindlich geworden.

Um den Einfluß von S auf die unteren Abschnitte des Verdauungstraktes zu prüfen, benutzten wir das Colon der Ratte, eine Methode, die von Feldberg und Toh (1953), ebenfalls von Benditt und Mitarbeitern (1955 a) angegeben wurde.

1.6 Wirkung von S auf das Colon der Ratte

Vom Colon der Ratte eignete sich für unsere Versuche der letzte Abschnitt der Pars descendens, die sehr empfindlich auf Acetylcholin und Serotonin anspricht. Auf Histamin reagiert dieses Präparat wenig bzw. gar nicht (Feldberg und Smith, 1954). Wir prüften die S-Wirkung in 32 Versuchen (21. bis 27. 5. 1959). Größere Ratten beiderlei Geschlechts, etwa 300 g schwer, kamen in den Versuch. Da das Ratten-Colon gern zu Spontanbewegungen neigt, wurden die Experimente bei 31 °C durchgeführt.

Ergebnisse

Wir beobachteten die S-Wirkung am Ratten-Colon bei verschiedenen Dosen. Wir sehen nach Gaben von 10^{-3} bis 10^{-2} ml/ml S eine dosisabhängige zweiphasige Reaktion (Abb. 12). Diese setzt sofort nach Applikation mit einer plötzlichen submaximalen Kontraktion ein. Nach wenigen Sekunden erschlafft das Organ wieder, meist ohne das Ausgangsniveau zu erreichen. Nun entwickelt sich noch innerhalb der 1. Minute nach Applikation eine langsame Tonuszunahme, die je nach Dosis in einigen Minuten submaximal oder maximal wird. Die Spontanbewegungen, wenn auch nur wenig reduziert, bleiben weiter bestehen. Obgleich es im Laufe mehrerer Minuten

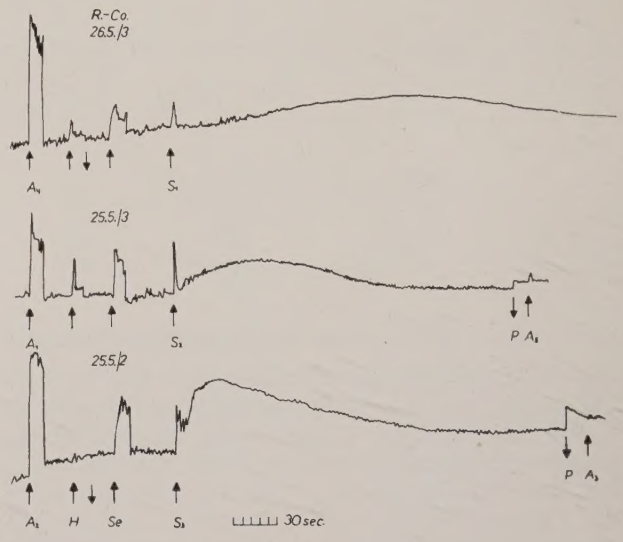


Abb. 12. Ratten-Colon

A_1	$6 \cdot 10^{-9}$	Se	10^{-7}
A_2	10^{-8}	H	$2 \cdot 10^{-8}$
A_3	$2 \cdot 10^{-8}$	S_1	10^{-3}
A_4	$4 \cdot 10^{-8}$	S_2	$2 \cdot 10^{-3}$
A_5	10^{-7}	S_3	10^{-2}

wieder zu einer Relaxation kommen kann, wird die Ausgangslage nicht mehr erreicht. Die Empfindlichkeit auf weitere Gaben Toxin oder Pharmaka ist erloschen, zumindest stark reduziert. Mit Gaben von $2 \cdot 2 \cdot 10^{-6}$ g/ml LSD ließ sich der biphasische Charakter der S-Wirkung nicht verändern.

1.7 Wirkung von S auf das rectale Coecum des Huhnes

Als letztes Organ aus dem Bereich des Verdauungstraktes haben wir den Einfluß von S auf das Coecum des Huhnes untersucht. Barsoum und Gaddum haben 1935 diese Methode beschrieben. Dieses Präparat wurde weniger gewählt, um noch eine andere Tierspezies in die Untersuchungen mit einzubeziehen, sondern weil nach Pernow (1953) das Hühner-Coecum besonders zur Differenzierung von Substanz P und Bradykinin geeignet ist. Weiter ist das Coecum vom Huhn Acetylcholin- und Serotonin-, weniger Histaminsensitiv.

Wir unternahmen 16 Versuche in der Zeit vom 23. 4. bis 2. 6. 1959. Das Coecum wurde ausgewachsenen Hühnern entnommen. Befreit von Eileitern und Bindegewebe wurde es 30 min im erwärmten Bad belassen. Während dieser Zeit, aber auch während des Versuchs, muß der registrierende Frontalschreiber beschwert werden, da das Coecum bei seiner Rigidität nach Kontraktionen nicht wieder zur Ausgangslage zurückkommt. Kräftiges Spülen nach jeder Reaktion ist bei diesem Präparat sehr wichtig.

Ergebnisse

Auf S $3 \cdot 10^{-4}$ ml/ml nimmt der Tonus des Hühner-Coecums stark zu und die Spontanrhythmik ab (Abb. 13). Die Latenzzeit ist kurz. Nach einer bestimmten Einwirkungsdauer wird ein Tonusmaximum erreicht, ein Dauerspasmus verhindert eine „spontane" Erschlaffung, auch bei beschwertem Frontalschreiber. Das Organ hat seine Reaktivität verloren.

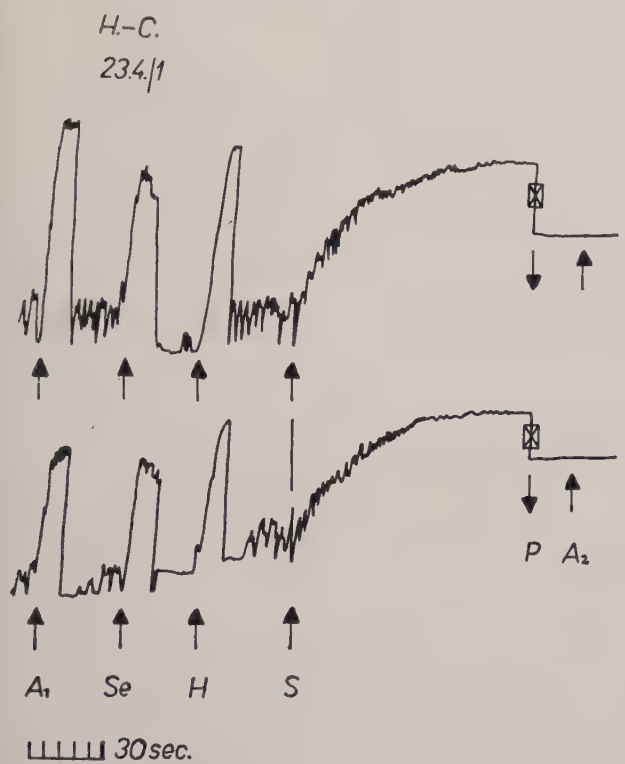


Abb. 13. Hühner-Coecum

A_1	$7 \cdot 10^{-10}$	H	$2 \cdot 10^{-6}$
A_2	$2 \cdot 10^{-8}$	S	$3 \cdot 10^{-4}$
Se	$3 \cdot 10^{-9}$		

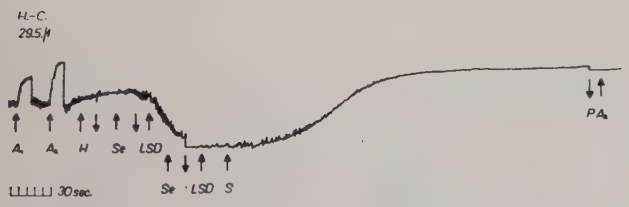


Abb. 14. Hühner-Coecum: Einfluß von LSD

A_1	$3 \cdot 10^{-9}$	H	$2 \cdot 10^{-7}$
A_2	$2 \cdot 10^{-8}$	LSD	$3 \cdot 10^{-7}$
Se	$2 \cdot 10^{-8}$	S	$3 \cdot 10^{-4}$

Nicht jedes unserer Präparate reagierte auf S, obgleich diese im allgemeinen auf die Testsubstanzen gut ansprachen. Derartige Präparate zeigten nach S-Applikation noch normale Acetylcholinempfindlichkeit.

Als Nebenbefund konnten wir nach Gaben von LSD eine Erschlaffung am Coecum beobachten (Abb. 14). Diese ist weder reversibel noch auswaschbar. Eine nachfolgende S-Reaktion nimmt unbeeinflußt den üblichen Verlauf.

Mit diesen Ergebnissen erhielten wir Kenntnis über die Wirkungen von S auf den Verdauungstrakt mehrerer Spezies. Eine Zusammenfassung der Befunde erscheint jedoch verfrüht, bevor wir nicht das Verhalten von anderen glattmuskulären Organen außerhalb des Magen-Darm-Kanals gegenüber S schildern.

Wir unternahmen Versuche an isolierten Uteri von Ratte und Meerschweinchen.

2. Die Wirkung von Staphylolysin auf den isolierten Uterus

2.1 Wirkung von S auf den Uterus der Ratte

Einleitung und Methodik

Dieses Organ wurde als Modell für eingehende Studien der S-Wirkungen aus mehreren Gründen gewählt. Zunächst kann man feststellen, daß der Uterus ohne von außen einwirkende Impulse die Fähigkeit zu spontanen, rhythmischen Kontraktionen zeigt (Literatur bei Greeff und Holtz, 1951), sich also in bestimmter Hinsicht wie der Darm verhält. Diese Eigenschaft ist nicht ausschließlich an Ganglienzellen gebunden, denn das Vorkommen von Ganglienzellen in der Uterusmuskulatur ist nach wie vor umstritten. Eine Prüfung myotroper Substanzen scheint hier also besonders günstig zu sein. Weiter ist der Ratten-Uterus hochempfindlich für Serotonin, reagiert empfindlich auch auf Acetylcholin und Adrenalin, jedoch auf Histamin in großen Dosen spricht er nicht an. Diese Merkmale des Ratten-Uterus ermöglichen in Verbindung mit spezifisch antagonistisch wirksamen Substanzen, in bestimmte Wirkungsmechanismen einzudringen. Weiterhin bietet sich der anatomische Bau des Uterus mit seinen zwei Hörnern für Vergleichsuntersuchungen geradezu an.

Methodik

Im Prinzip handelt es sich um eine gut und eingehend beschriebene, im pharmakologischen Experiment übliche Methode (Erspamer, 1942; de Jalon und Mitarbeiter, 1945; Gaddum und Mitarbeiter, 1954). Da jedoch Variationen in der Anordnung üblich sind, sei das Wesentliche skizziert.

Uteri wurden 250 g schweren Ratten entnommen. Es wurden von uns ausschließlich multipare Tiere verwandt. Die Uterushörner dieser Tiere haben einen Durchmesser von etwa 5 mm und sprechen gut auf Serotonin an (Leitch, Maryn und Moore, 1958). Jüngere Tiere haben den Nachteil eines zu kleinen Organs. Ein Teil der Tiere war durch Applikation von 200 μg/kg Oestradiolbenzoat einen Tag vor dem Versuch in den Oestrus gebracht worden. Obgleich man oft den Eindruck hatte, daß derartig vorbehandelte Uteri weniger Spontanbewegungen zeigen und empfindlicher reagieren, konnten keine Unterschiede in der Reaktionsweise auf S gegenüber unbehandelten Uteri festgestellt werden. Eine Verminderung der Spontanreaktionen wird ebenfalls erreicht, wenn man bei nicht zu hohen Temperaturen arbeitet. Wir führten die Versuche bei 29 °C durch.

Die entnommenen Uteri wurden gesäubert und je ein Uterushorn in ein etwa 5 ml großes Gefäß gehängt, das mit sauerstoffdurchperlter Flüssigkeit gefüllt

war. Die Nährlösung war eine modifizierte Ringerlösung und hatte folgende Zusammensetzung: 9,0 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,06 g $CaCl_2$, 0,5 g $NaHCO_3$, 0,5 g Glukose ad 1000 ml aq. dest. (Im Vergleich zur Ringerlösung ist das $CaCl_2$ in der Lösung um $^3/_4$ vermindert und die Glukose um die Hälfte.) Unser Vorgehen entsprach der beim Darm geschilderten Anordnung. Da es sich beim Uterus um ein besonders kapriziöses Organ handelt, ist die Einhaltung eines Versuchsschemas sehr wichtig, um gute, reproduzierbare Reaktionen zu erhalten. Die Testsubstanzen wurden appliziert und konnten 1 min auf das Uterushorn einwirken, dann wurde kräftig gespült und bis zur nächsten Gabe 5 min gewartet. Das S wurde aus naheliegenden Gründen länger in der Badflüssigkeit belassen. Bei der Prüfung auf antagonistische bzw. synergistische Wirkungen wurde meist 4 min vor der S-Gabe nur einem Uterushorn die entsprechende Substanz verabreicht, während das andere Horn als Kontrolle lief. Nach Ablauf der S-Reaktion wurde kräftig gespült und dann in den meisten Fällen die Reaktivität geprüft. Vor Beginn des Versuches wurde der Uterus 20 min in Ruhe gelassen, der Frontalschreiber war zur Erteilung der notwendigen Spannung mit einem Gewicht von 2 g belastet.

Insgesamt haben wir über 250 Versuche am Ratten-Uterus durchgeführt. Nähere Angaben finden sich bei den einzelnen Versuchsaufgaben. Die Konzentrationen sind in g bzw. ml/ml angegeben.

Ergebnisse

Die Wirkungen von S am isolierten Uterus der Ratte lassen sich an unserem 1. Versuch (4. 3. 1959 mit S_I) (Abb. 15) zeigen. Mit mehreren Dosen Acetylcholin bestimmten wir zunächst die Ansprechbarkeit der Uterushörner bei submaximaler und maximaler Kontraktion. Auf Histamin zeigte der Uterus, auch bei Anwendung großer Konzentrationen, $2 \cdot 10^{-5}$ g/ml, keine Empfindlichkeit. Wir begannen S in Mengen von $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} ml/ml zu applizieren. Da nach 2 min keine Reaktion festzustellen war, wurde die Badflüssigkeit mehrere Male gewechselt und nach 5 min Pause eine höhere Dosis S gegeben. Zwischendurch wurde die Empfindlichkeit des Uterus auf Acetylcholin geprüft. Diese hatte sich kaum verändert. Die Applikation von $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S hatte nach einer Latenzzeit von wenigen Minuten eine verstärkte Tonisierung beider Uterushörner zur Folge. Die Tonisierung wiederum führte in wenigen Minuten zu einer maximalen Kontraktur. Häufiger Wechsel der Badflüssigkeit nach der Reaktion ließ den Uterus nur wenig erschlaffen. Es hatte sich ein irreversibler Dauerspasmus eingestellt. Die Empfindlichkeit des Organs auf Acetylcholin war erloschen.

Dieses Verhalten des Uterus gab zu mehreren Überlegungen Anlaß. Zunächst untersuchten wir die Reaktionsweise des Uterus auf S und schenkten den Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung unsere Aufmerksamkeit.

2.11 Dosis/Wirkungsbeziehungen

Die Untersuchungen wurden in einem Dosisbereich von $2 \cdot 10^{-4}$ ml/ml S_I durchgeführt. Der Uterus der Ratte reagiert in Abhängigkeit von der Dosis sehr verschieden. Bei niederen Dosen, $2 \cdot 10^{-4}$ bis $4 \cdot 10^{-4}$ ml/ml S, erscheinen nach einer langen Latenzzeit regelmäßig Kontraktionen und Relaxationen des Organs (Abb. 16, oben). Diese Art der Reaktion kann bis zu mehreren Stunden anhalten, sofern die Badflüssigkeit nicht gewechselt wird. Auch kann es dabei zu einer geringen Tonisierung kommen, die im Verlaufe der weiteren Reaktion wieder verschwindet. Nach Auswaschen und Spülen des Organs ist normales Reagieren auf Testsubstanzen, aber auch Toxin vorhanden, wie wir später zeigen werden. Kontrollversuche an Uteri, die sich nicht spontan kontrahierten, zeigen nach der üblichen Prozedur zur Feststellung der Empfindlichkeit auf Testsubstanzen innerhalb von 4 Stunden keine Kontraktionen und Relaxationen.

Auf höhere S-Dosen, ab $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml und mehr, reagiert der Uterus nach einer Latenzzeit mit einer ver-

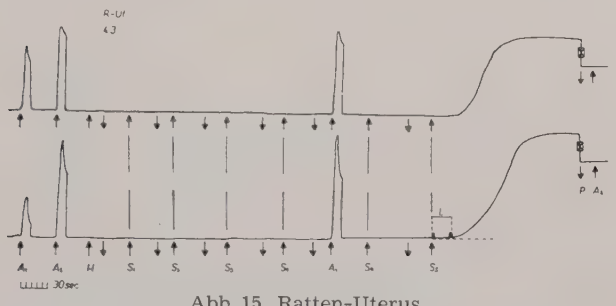


Abb. 15. Ratten-Uterus

A_1	10^{-7}	S_2	10^{-4}
A_2	$2 \cdot 10^{-7}$	S_3	$2 \cdot 10^{-4}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$	S_4	10^{-3}
S_1	$2 \cdot 10^{-5}$	S_5	$2 \cdot 10^{-3}$

A $\overset{L}{—}$ B = Latenzzeit

⊠ = künstliche Relaxation

Dosenintervall 5 min

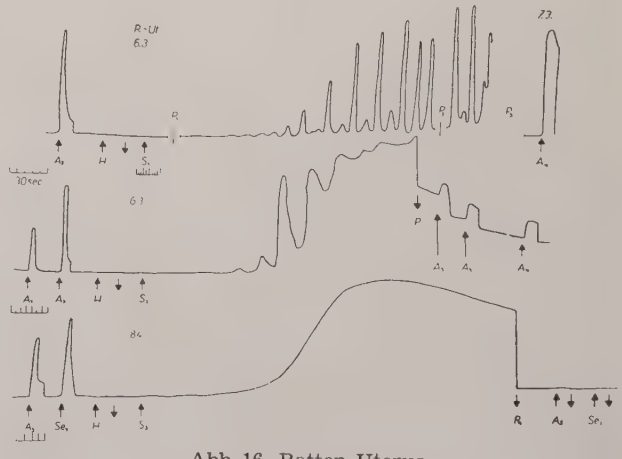


Abb. 16. Ratten-Uterus

A_1	$2 \cdot 10^{-8}$	S_1	$2 \cdot 10^{-4}$
A_2	$4 \cdot 10^{-8}$	S_2	10^{-3}
A_3	10^{-7}	S_3	$2 \cdot 10^{-3}$
A_4	$2 \cdot 10^{-7}$		
A_5	10^{-6}	P_1 =	40 min
Se_1	$2 \cdot 10^{-8}$	P_2 =	54 min
Se_2	10^{-6}	P_3 =	18 h
H	$2 \cdot 10^{-5}$	P_4 =	100 min

stärkten Tonuszunahme, die langsam mehr und mehr zunimmt und in einer maximalen Kontraktur ihren Abschluß findet (Abb. 16, unten). Dieser Zustand bleibt bestehen auch bei wiederholtem Wechsel der Perfusionsflüssigkeit. Das Organ ist unempfindlich geworden und reagiert weder auf Acetylcholin noch Serotonin. Auch nach spontaner Relaxation, die erst nach etwa 2 Stunden das Ausgangsniveau wieder erreicht, bleibt der Uterus unansprechbar auf Testsubstanzen (siehe auch Abb. 23 und 24).

Bei der Anwendung von S in Mengen, die zwischen den eben geschilderten Dosen liegen, sehen wir nach einer Latenzperiode ebenfalls vermehrt Kontraktionen auftreten (Abb. 16, Mitte). Der Tonusanstieg ist jedoch schon deutlich ausgeprägt, und eine maximale Kontraktur wird beobachtet. Nach starkem Spülen kommt es spontan, wenn auch nur zögernd, zu Relaxationen bei oftmals reduzierter Empfindlichkeit auf Acetylcholin und Serotonin. Toxingaben sind hier noch wirkungsvoll, wie noch an anderer Stelle gezeigt wird.

2.12 Die Latenzzeit

Die dosisabhängige Reaktionsweise des Uterus auf S findet aber noch in einem weiteren Charakteristikum ihren Ausdruck. Die Wirkung von S beginnt am Uterus nicht sofort nach Applikation des Toxins, sondern, wie wir schon erwähnt haben, nach einer Latenzzeit, die sich in Abhängigkeit von der gewählten Dosis und der Suszeptibilität des Uterus entwickelt.

[Unter Latenzzeit verstehen wir diejenige Zeit in Minuten zwischen Applikation des Toxins und Beginn der Tonuszunahme bzw. der Kontraktion. Sie läßt sich leicht bestimmen, wenn man an die Niveaulinie ein Lineal anlegt. An der Stelle, wo die Niveaulinie sich von der Kante des Lineals nach oben bewegt, ist die Latenzzeit zu Ende (siehe Abb. 15, L).]

Bei Anwendung niederer Dosen dauert die Latenzzeit bis zu 40 min länger, während bei 10^{-2} ml/ml S schon nach 2 min die Tonuszunahme beginnt. Die Beziehungen zwischen Dosis und Latenzzeit sind für eine Reihe von Versuchen mit S_I in der Abbildung 17 dargestellt. Damit waren wir in der Lage, quantitative Bedingungen, die zu qualitativen Veränderungen führen, meßbar zu machen. Diese Möglichkeit gestattete uns, verschiedene Staphylolysine in ihrer pharmakologischen Aktivität zu vergleichen.

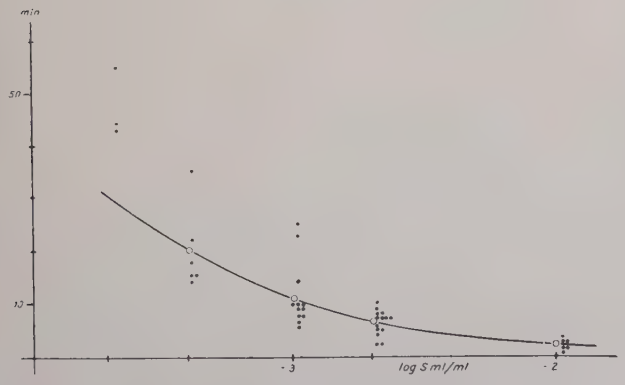


Abb. 17. Ratten-Uterus: Dosis/Latenzzeit-Beziehungen
Abszisse: S-Konzentration in log ml/ml
Ordinate: Zeit in min

2.13 Vergleich von zwei Chargen S

Die nachfolgenden Versuche wurden wie schon die Darmversuche mit 2 Chargen S durchgeführt; zunächst folgt ein Vergleich der Dosis/Latenzzeit-Beziehung dieser beiden Staphylolysine, S_I und S_{II}. In dem Dosisbereich von 10^{-3} bis 10^{-2} ml/ml S verläuft die Kurve aus den Mittelwerten ziemlich linear. Die Hinzufügung der noch mit S_I bis zum 1. 7. 1959 durchgeführten Versuche am Uterus läßt im halblogarithmischen Netz eine Gerade erkennen, auch wenn ein großer Maßstab gewählt wird (Abb. 18). Die entsprechenden Latenzzeiten, die bei S_{II} mit den Dosen $4 \cdot 10^{-3}$ bis $2 \cdot 10^{-2}$ ml/ml S erhalten wurden, sind wie in Abb. 17 als Mittelwert mit der Angabe der Einzelversuche eingezeichnet. Beide Staphylolysine zeigen in bezug auf ihre pharmakologische Wirkung am Ratten-Uterus gute Übereinstimmung, obgleich ihr Herstellungsdatum um über 2 Monate differiert.

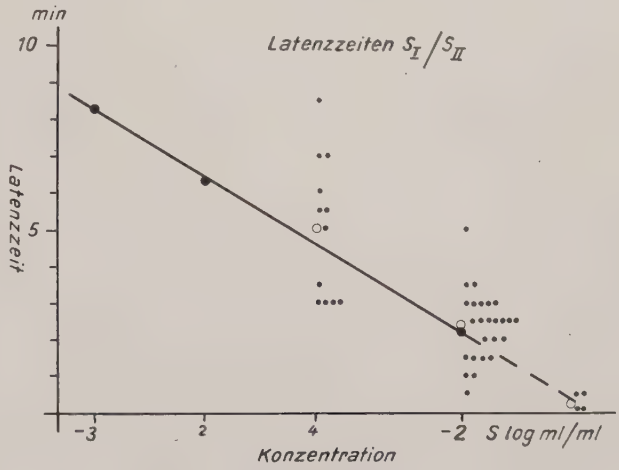


Abb. 18. Ratten-Uterus: Vergleich von S_I und S_{II}
Koordinaten siehe Abb. 17
S_I ●
S_{II} ○

2.14 Einflußnahme auf die S-Reaktion während der Latenzzeit

Am Uterus der Ratte kommt es, wie wir schon wissen, bei Gaben von S nach einer definierten Latenzzeit zu verstärkten Kontraktionen mit und ohne Tonuszunahme, oftmals verstärkt sich der Tonus langsam auch ohne Kontraktionen, bis sich eine maximale Kontraktur einstellt. Damit ist in den meisten Fällen ein irreversibler Verlust der Empfindlichkeit des Organs verbunden, der auch bestehen bleibt, wenn nach mehrmaligem Wechsel des Bades eine spontane Relaxation des Uterus eingetreten ist. Wir wandten unsere Aufmerksamkeit der Latenzzeit zu. Uns interessierte, ob es möglich war, während der Latenzzeit die nachfolgende S-Reaktion zu beeinflussen.

Zur Klärung dieser Frage führten wir 14 Versuche vom 6. bis 9. 4. 1959 durch. Da in den meisten Fällen die Hörner des gleichen Uterus ähnlich reagieren, wurden die Experimente entsprechend angesetzt. Wir benutzten eine S-Dosis von $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml als Testdosis. Diese führte ziemlich regelmäßig am Uterus nach einer bestimmten Latenzzeit, wie uns aus den vergangenen

Versuchen bekannt war, zur maximalen Kontraktur. In verschiedenen zeitlichen Abständen nach Applikation des Toxins wurde die Badflüssigkeit an dem einen Uterushorn gewechselt und kräftig gespült.

Ergebnisse

Wenn innerhalb von 2 min nach Applikation von $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S das Bad ersetzt wird, kommt es zu keiner Reaktion (Abb. 19). Wird jedoch erst 4 min nach Toxinverabreichung gespült, tritt die Reaktion in ihrer üblichen Form, manchmal nur wenig abgeschwächt,

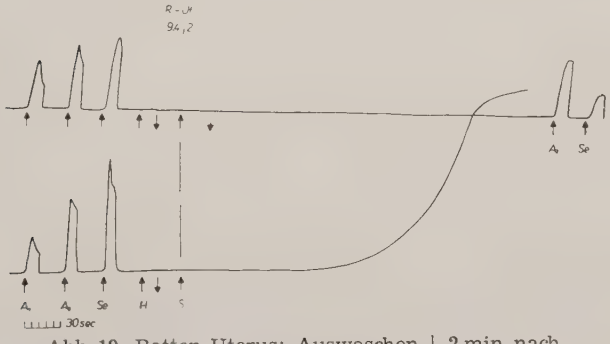


Abb. 19. Ratten-Uterus: Auswaschen ↓ 2 min nach Toxingabe

A_1	10^{-7}	H	$2 \cdot 10^{-5}$
A_2	$2 \cdot 10^{-7}$	S	$2 \cdot 10^{-3}$
Se	10^{-7}		

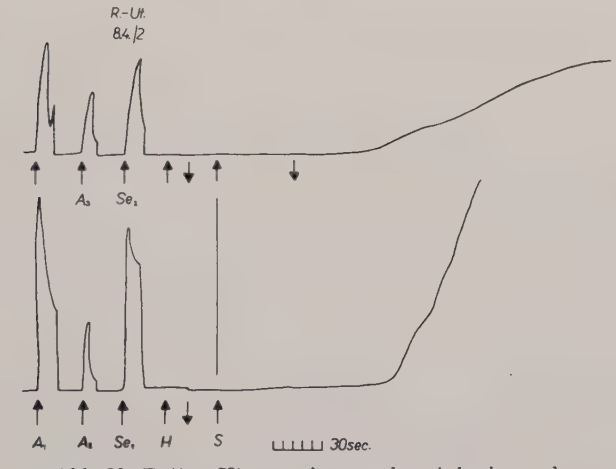


Abb. 20. Ratten-Uterus: Auswaschen ↓ 4 min nach Toxingabe

A_1	10^{-7}	Se_2	10^{-7}
A_2	$2 \cdot 10^{-8}$	H	$2 \cdot 10^{-5}$
A_3	$4 \cdot 10^{-8}$	S	$2 \cdot 10^{-3}$
Se_1	$4 \cdot 10^{-8}$		

auf (Abb. 20). Während im ersten Fall die Ansprechbarkeit des Uterus unverändert normal ist, verschwindet diese, wenn maximale Kontraktion und Dauerkrampf die Reaktion beenden. Das Waschen während der Latenzperiode führt somit zu verschiedenen Effekten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Spülung nach der S-Applikation.

2.15 Einfluß von Antagonisten auf die S-Reaktion am Uterus (mit Methodik)

Um das pharmakodynamisch aktive Prinzip des Toxins näher definieren zu können, führten wir Versuche zur Antagonisierung der S-Wirkung am Uterus durch.

Die hohe Serotoninempfindlichkeit des Organs fanden wir in unseren Versuchen bestätigt; in gleicher Weise konnten wir mit kleinen Dosen Acetylcholin den Uterus zur Kontraktion bringen. Adrenalin, das am Uterus der Ratte inhibitorisch wirkt, interessierte im Zusammenhang mit S weniger, da niemals spasmolytische Effekte aufgetreten waren. Feldberg und Mitarbeiter (1937/38) hatten in einigen Arbeiten zeigen können, daß bei der Perfusion von Meerschweinchen- und Katzenlungen mit Schlangen- bzw. Staphylokokkentoxin im Perfusat sich ein Stoff anreicherte, der mit Histamin identisch zu sein schien. Es ist naheliegend, auch bei der Wirkung von S einen Einfluß von Histamin in Betracht zu ziehen. Diese Frage am Ratten-Uterus zu klären, war leicht, da dieser, wie bekannt, auf hohe Dosen Histamin nicht anspricht.

Unsere Studien zur Antagonisierung der S-Effekte am Uterus wurden jeweils am gleichen Organ durchgeführt. Wir wandten dabei 2 Methoden an.

Methode 1

Nach Feststellung der Empfindlichkeit der Uterushörner applizierten wir beiden Organteilen die gleiche Dosis S und gaben auf der Höhe der Kontraktion den „Antagonisten" ebenfalls in beide Gefäße.

Methode 2

Wir prüften wie üblich die Empfindlichkeit des Organs und gaben dann 4 min vor Applikation von S dem einen Präparat vorher den „Antagonisten". Dieses Vorgehen hatten wir vorher bei den Organen des Verdauungstraktes ebenfalls angewandt.

2.15.1 Einfluß von Adrenalin

In einigen Versuchen konnten wir zeigen, daß kleine Mengen von Adrenalin $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml auf der Höhe der Kontraktion (Methode 1) die durch S bedingte maximale Kontraktur nicht beeinflussen. Erst höhere Dosen $8 \cdot 10^{-6}$ g/ml Adrenalin relaxieren den Uterus sogar noch 50 min nach S-Applikation (Abb. 21). Ähnliche Befunde haben Quilliam und Mitarbeiter am Kaninchen-Jejunum erhalten. Während Acetylcholin und auch weitere Toxingaben zu keiner Reaktion am Uterus mehr führten, rief $BaCl_2$ $2 \cdot 10^{-4}$ g/ml noch eine schwache Verkürzung des Uterusmuskels hervor.

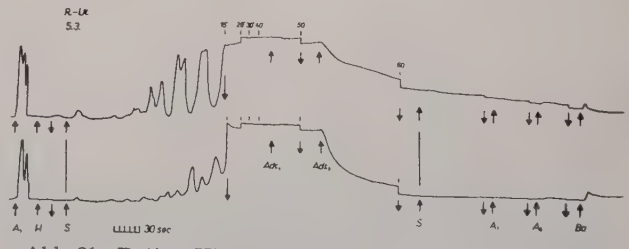


Abb. 21. Ratten-Uterus: Einfluß von Adrenalin (Adr.)

A_1	$4 \cdot 10^{-8}$	$Adr._2$	$8 \cdot 10^{-6}$
A_2	10^{-7}	$Ba = BaCl_2$	$2 \cdot 10^{-4}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$	S	10^{-3}
$Adr._1$	$2 \cdot 10^{-6}$		

15′, 40′ = min nach Toxingabe

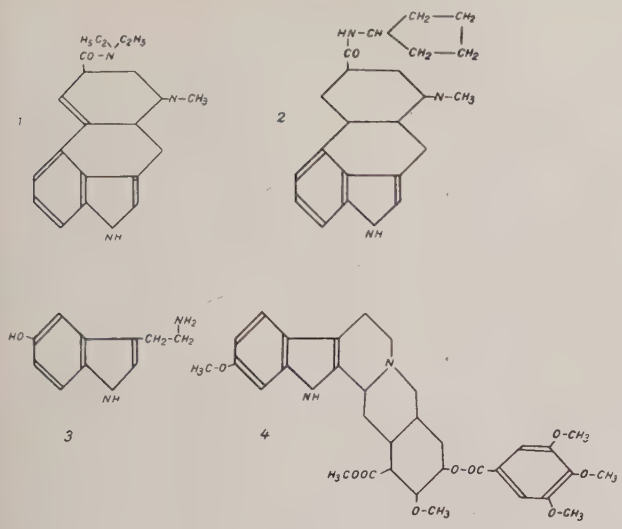


Abb. 22

1 D-Lysergsäurediäthylamid (LSD)
2 Cepentyl, Cyclopentylamid der D-Lysergsäure (C)
3 Serotonin, 5-Oxytryptamin (Se)
4 Reserpin, 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure des Methyl-reserpats (R)

Zur Feststellung antagonistischer Tendenzen durch Atropin, LSD und Cepentyl (siehe Formel Abb. $22_{1,2}$) führten wir zunächst 10 orientierende Versuche vom 11. bis 14. 3. 1959 durch.

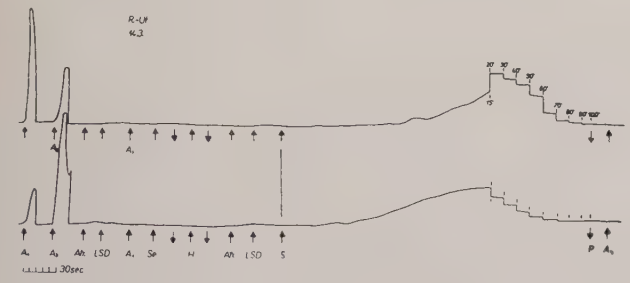


Abb. 23. Ratten-Uterus: Einfluß von Atropin und LSD

A_1	$2 \cdot 10^{-8}$	H	$2 \cdot 10^{-5}$
A_2	10^{-8}	Atr.	$5 \cdot 10^{-7}$
A_3	10^{-7}	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$
A_4	$2 \cdot 10^{-7}$	S	$2 \cdot 10^{-3}$
Se	$2 \cdot 10^{-8}$		

20′, 30′, 40′ = min nach Toxingabe

Abb. 24. Ratten-Uterus: Einfluß von Atropin und Cepentyl (C)

A_1	10^{-7}	Atr.	$5 \cdot 10^{-7}$
A_2	$2 \cdot 10^{-7}$	C	$2 \cdot 10^{-6}$
Se_1	10^{-7}	Ba	$2 \cdot 10^{-4}$
Se_2	10^{-6}	S	$2 \cdot 10^{-3}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$		

Nach Gaben von $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml Atropin und $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml LSD vor der S-Gabe verlief die S-Reaktion ($2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml) stark abgeschwächt (Abb. 23). Wir erhielten jedoch eine S-Reaktion in der bekannten Art, wenn an Stelle von LSD, Cepentyl in gleicher Menge angewandt wurden (Abb. 24).

Diese Versuche gaben den Hinweis, daß LSD sicher einen Einfluß auf die S-Reaktion hatte.

2.15.2 Einfluß von Atropin

In 10 Versuchen in der Zeit vom 10. bis 18. 4. 1959 gaben wir nach der 2. Methode Atropin in Mengen von $2 \cdot 1{,}5 \cdot 10^{-7}$ g/ml vor der S-Applikation und erhielten wie erwartet einen negativen Befund (Abb. 25).

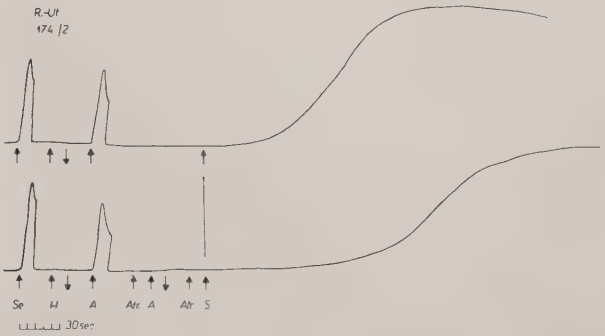


Abb. 25. Ratten-Uterus: Einfluß von Atropin

A	10^{-7}	Atr.	$1{,}5 \cdot 10^{-7}$
Se	$4 \cdot 10^{-8}$	S	$2 \cdot 10^{-3}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$		

2.15.3 Einfluß von Lysergsäurediäthylamid

Zur Bestimmung des Einflusses von LSD auf die S-Reaktion am Uterus der Ratte wurden in der Zeit vom 16. bis 23. 3. 1959 18 Versuche mit S_I und am 9. 7. 1959

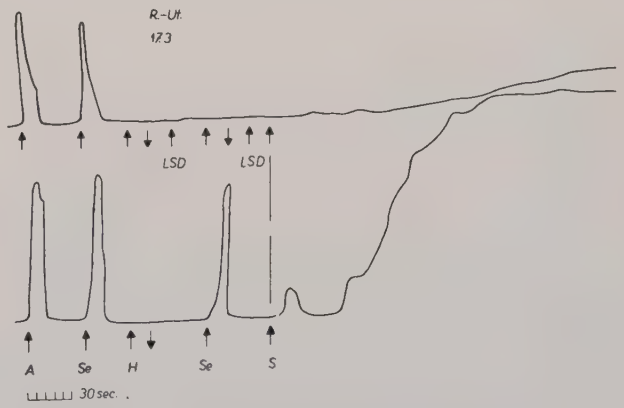


Abb. 26. Ratten-Uterus: Einfluß von LSD

A	10^{-7}	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$
Se	10^{-7}	S	$2 \cdot 10^{-3}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$		

3 Versuche mit S_{II} durchgeführt. Es kam nur die 2. Methode zur Anwendung. Durch $2 \cdot 2 \cdot 10^{-6}$ g/ml LSD konnten wir die durch $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml S_I ausgelöste Tonisierung stark reduzieren (Abb. 26). Eine vollständige Blockierung der S_I-Reaktion sahen wir in 2 von insgesamt 8 Versuchen. Bei S_{II} 10^{-2} ml/ml, das sich etwas schwächer zeigte, haben wir in zwei Versuchen die

Reaktion mit LSD völlig unterdrücken können, in einem Versuch war nur die Latenzzeit verlängert, die Tonisierung geschah in der üblichen Weise. Eine Erhöhung der LSD-Dosis führt allein nicht zur Blockierung der S-Wirkung, sondern läßt den hemmenden Einfluß nur länger anhalten. Regelmäßig ließ sich jedoch der S-Effekt ausschalten, wenn wir mit kleineren Konzentrationen des Toxins arbeiteten. Wir führten einen „gekreuzten Test" durch (Anwendung des gleichen Versuchsschemas hintereinander mit Wechsel der Präparationen).

[Wendet man eine nicht zu hohe Konzentration von S an, etwa 10^{-3} ml/ml, so kommt es nach längerer Latenz neben einer Tonisierung zu verstärkten Kontraktionen, wie wir schon gesehen haben (Abb. 16). Wechselt man das Bad nach einer gewissen Einwirkungszeit, so findet sich in den meisten Fällen eine normale Ansprechbarkeit des Organs auf Testsubstanzen wie auf Toxin.]

Ein Organteil bekommt als Kontrolle 10^{-3} ml/ml S, das andere LSD in der üblichen Konzentration und dann erst das Toxin (Abb. 27). Nach Ablauf der Latenzzeit reagiert der Kontrolluterus mit verstärkten Kontraktionen und geringerer Tonisierung über eine Stunde lang, während der LSD-vorbehandelte Uterus ohne Reaktion auf S bleibt. Etwa 100 min nach S-Applikation wird kräftig gespült und die Badflüssigkeit gewechselt. Die Kontraktionen verschwinden wieder. Normale Empfindlichkeit zumindest auf Acetylcholin ist vorhanden. LSD, das bis zu 2 Stunden wirken kann, verhindert noch die Serotoninkontraktion. Nach entsprechender Wartezeit gibt man dem Uterushorn, das im ersten Teil des Versuchs als Kontrolle diente, LSD vor der 2. S-Applikation. Jetzt entwickelt sich bei höherer S-Konzentration an dem nun nicht mehr durch LSD blockierten Uterushorn langsam eine Tonuszunahme bis zur maximalen Kontraktur, während das andere deutlich gehemmt ist. Nach wiederholtem Wechsel des Bades ist an diesem Uterusteil die Ansprechbarkeit auf Acetylcholin, Serotonin und S ververschwunden.

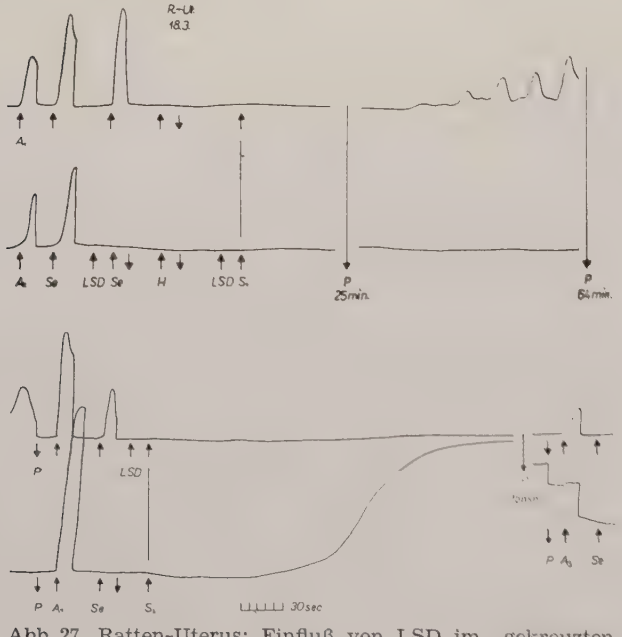


Abb. 27. Ratten-Uterus: Einfluß von LSD im „gekreuzten Test"

A_1	10^{-7}	H	$2 \cdot 10^{-5}$
A_2	$2 \cdot 10^{-8}$	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$
A_3	$2 \cdot 10^{-7}$	S_1	10^{-3}
Se	10^{-7}	S_2	$2 \cdot 10^{-3}$

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Vorbehandlung der Uteri mit LSD zu einer Blockierung der S-Wirkungen am Uterus führt.

2.15.4 Einfluß von Cepentyl

Cepentyl ist strukturell chemisch verwandt mit Lysergsäurediäthylamid. Es unterscheidet sich von LSD durch geringfügige Veränderungen in der Seitenkette (Abb. 22). Pharmakologisch ist dieser Körper von Votava, Podvalova u. a. (1958) untersucht worden. Neben einer stark oxytocischen Wirkung (Kaninchen und Mensch), die therapeutisch genutzt wird, ist Cepentyl stark Serotonin-antagonistisch. Am Ratten-Duodenum übertrifft Cepentyl die Antiserotoninwirkung von LSD, am Ratten-Uterus ist es nur halb so wirksam wie LSD. Über zentrale Wirkungen verfügt Cepentyl zum Unterschied von LSD nicht.

Wir konnten in 16 Versuchen (23. 4. 1959) zeigen, daß auch Cepentyl einen hemmenden Einfluß auf die S-Wirkung hat. Während $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml ohne Effekt auf die Tonuserhöhung durch S ist, konnten wir bei Verdoppelung der Dosis einen geringen Hemmeffekt in 3 von insgesamt 5 Versuchen sehen. Eine weitere Erhöhung der Cepentylkonzentration auf $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ g/ml führt regelmäßig zu einer vollständigen Blockierung der durch S, $2 \cdot 10^{-3}$ ml/ml, ausgelösten Reaktion (Abb. 28). In diesen Versuchen entspricht die serotoninhemmende Dosis von Cepentyl derjenigen von LSD; zur vollständigen Hemmung der S-Wirkung waren jedoch höhere Cepentylkonzentrationen erforderlich. Bei den Organen, die durch Vorbehandlung mit Cepentyl nicht auf S reagierten, konnte nach Einwirkung von S kein Ansprechen mehr auf die Testsubstanzen beobachtet werden; zumindest war die Reaktivität stark reduziert.

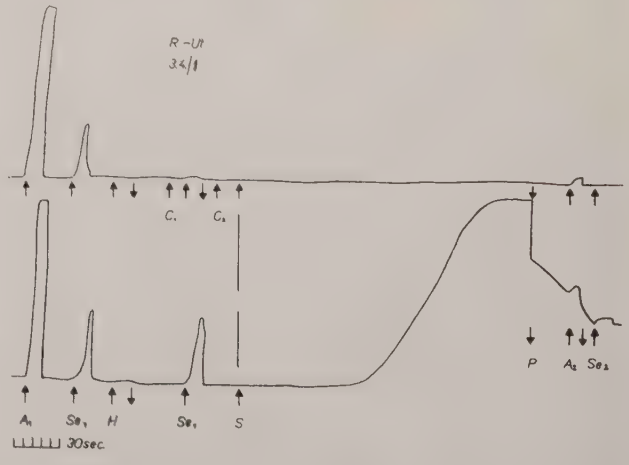


Abb. 28. Ratten-Uterus: Einfluß von Cepentyl

A_1	10^{-8}	H	$2 \cdot 10^{-5}$
A_2	$2 \cdot 10^{-7}$	C_1	$2 \cdot 10^{-6}$
Se_1	$2 \cdot 10^{-6}$	C_2	$1{,}2 \cdot 10^{-5}$
Se_2	10^{-6}	S	$2 \cdot 10^{-3}$

2.15.5 Einfluß von Reserpin

Reserpin ist wie LSD und Cepentyl als Indolabkömmling anzusehen (Abb. 22₄). Die antagonistische Wirkung von Reserpin zu Serotonin am Ratten-Uterus wurde von Costa (1956) mitgeteilt. Danach sollen Mengen von $4 \cdot 10^{-7}$ g/ml Reserpin Serotoninkontraktionen verhindern. Der Serotoninantagonismus von Reserpin ließ sich in unseren Versuchen auch mit 5—10mal höheren Konzentrationen nicht bestätigen. Wir führten nach der 2. Methode ausschließlich mit S_{II} in der Zeit vom 18. bis 22. 9. 1959 11 Versuche durch. Die S-Dosen betrugen $4 \cdot 10^{-3}$—10^{-2} ml/ml. Reserpin wurde in Mengen von 2—$4 \cdot 10^{-6}$ g/ml angewandt. In 9 Versuchen wurde die S-Reaktion fast völlig unterdrückt (Abb. 29),

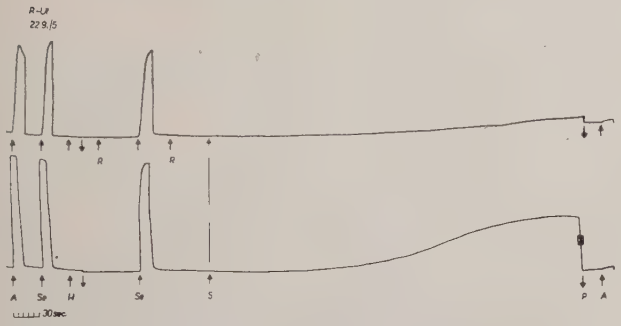


Abb. 29. Ratten-Uterus: Einfluß von Reserpin (R)

A	$2 \cdot 10^{-7}$	R	$2 \cdot 10^{-6}$
Se	10^{-7}	S	$4 \cdot 10^{-3}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$		

in 2 Versuchen war Reserpin ohne Einfluß. Nach Beendigung der S-Wirkung durch Wechsel der Nährlösung fanden wir die Empfindlichkeit auf Acetylcholin auch bei den mit Reserpin vorbehandelten Uteri stark reduziert.

2.15.6 Einfluß von Chlorpromazin

Neben der Antihistaminwirkung verfügt Chlorpromazin auch über andere Eigenschaften. In den letzten Jahren ist die Antiserotoninwirkung dieses Stoffes durch mehrere Autoren (Gyermek, Lazar und Czak 1956, Costa 1956, Greeff 1959, Parratt und West 1958, Schmid, Zicha, Scheiffarth und Büttner 1959, Mörsdorff und Bode 1959 u. a.) bekannt geworden. Die Menge Chlorpromazin, die Serotonin am Ratten-Uterus antagonisiert, geben Gyermek und Mitarbeiter mit $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ g/ml und Costa mit 10^{-7} g/ml an.

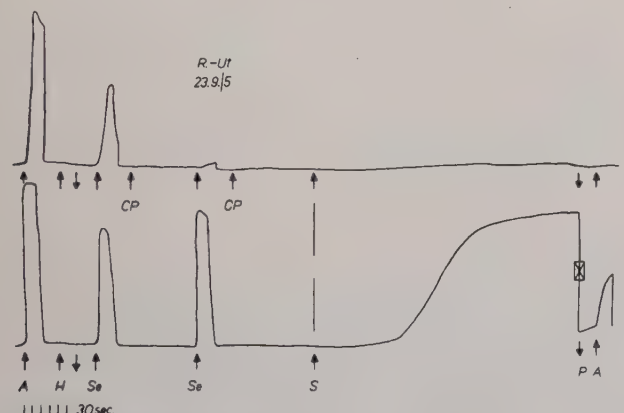


Abb. 30. Ratten-Uterus: Einfluß von Chlorpromazin (CP)

A	$2 \cdot 10^{-7}$	CP	$2 \cdot 10^{-6}$
Se	$2 \cdot 10^{-8}$	S	$4 \cdot 10^{-3}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$		

⊠ = künstliche Relaxation

Wir unternahmen 12 Versuche in der Zeit vom 23. 9. bis 31. 10. 1959 nach der 2. Methode mit S_{II} und fanden entsprechend Gyermek eine antagonistische Wirkung mit $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml Chlorpromazin gegenüber Serotonin. Die doppelte Dosis war in der Lage, auch die durch S, $4 \cdot 10^{-3}$—10^{-2} ml/ml, ausgelöste Kontraktion zu unterdrücken (Abb. 30). Kleinere Mengen von Chlorpromazin appliziert, demonstrieren immer nur eine Serotoninhemmung, haben aber keine sicheren Effekte auf die S-Wirkung. Nach Abschluß des Versuchs ist das Organ auf Testsubstanzen nicht mehr so empfindlich, wie zu Beginn des Versuchs.

2.16 Einfluß von Prostigmin

Aus Gründen der Vollständigkeit sei an dieser Stelle eine Studie von 5 Versuchen (28./29. 9. 1959) mit Prostigmin aufgeführt. Damit sollte unsere Annahme, daß Acetylcholin beim Zustandekommen der S-Reaktion keine Rolle spielt (negativer Atropin-Einfluß), noch einmal bestätigt werden. Prostigmin, $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml, führte zu einer erhöhten Acetylcholinkontraktion, war jedoch ohne Effekt auf die S-Wirkung.

2.17 Wirkung von auf 100 °C erhitztem S

Diese Versuche dienten zur weiteren Charakterisierung des von uns verwendeten Toxins und zeigen, daß bei der Wirkung von S Eigenschaften enterotoxischer Art (Sedlak 1958, Stolmakova 1954, 1957) keine Rolle spielen. Weiter wollten wir feststellen, ob der die S-Wirkung auslösende Faktor durch Hitzeeinwirkung zerstört werden kann.

In 5 Versuchen vom 7. bis 10. 11. 1959 prüften wir das Verhalten von S_{II}, das vor Beginn des Versuches 3 min in einem Wasserbad auf 100 °C erhitzt war. Das sonst in der Ampulle klar und durchsichtig erscheinende S wird durch diese Behandlung trübe.

Ergebnisse

S in Dosen von 10^{-2}—$2 \cdot 10^{-2}$ ml/ml führt am Ratten-Uterus zu keiner Reaktion, wenn S vorher auf 100 °C erhitzt wird. Das Reagieren auf Acetylcholin als Testsubstanz ist nach Wechsel des Bades bei der mit aufgekochtem S behandelten Präparation nicht verändert. Die andere Präparation hatte als Kontrolle unvorbehandeltes S erhalten und sprach nach Ablauf der S-Reaktion auf Testsubstanzen nicht mehr an.

2.18 Der Einfluß der Lagerungstemperatur auf die pharmakologische Aktivität von S

Diese Versuche wurden unternommen, um die von uns untersuchte Charge S_{II}, die wir bei −10 °C, +2 °C und +20 °C über mehrere Monate gelagert hatten, in ihrer pharmakologischen Aktivität zu vergleichen. Einige Versuche wurden auch mit S lyo. durchgeführt.

Die pharmakologische Aktivität wurde am Uterus der Ratte untersucht. Wir verglichen die Latenzzeit

und Geschwindigkeit des Anstiegs nach der S-Applikation. Die Spülung wurde meist kurz nach Erreichen der maximalen Kontraktur durchgeführt. Insgesamt 12 Versuche wurden am 19. und 20. 1. 1960 unternommen, S lyo. und S_{II} −10 °C am 20. 11. 1959 verglichen.

Ergebnisse

Wir stellten die Wirkungen von S_{II} −10 °C und S lyo. in einer Konzentration von 10^{-2} ml/ml gegenüber und fanden die Aktivität von S lyo. entsprechend der Latenzzeit höher (Abb. 31). In einer weiteren Versuchs-

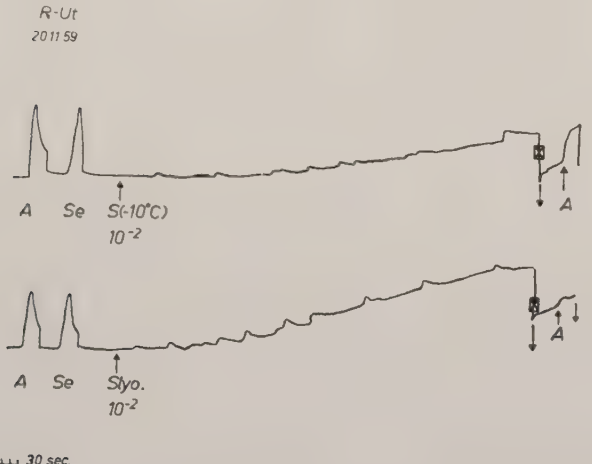


Abb. 31. Ratten-Uterus: Vergleich S lyo. und S_{II} (−10 °C)

A	$2 \cdot 10^{-7}$	S lyo.	10^{-2}
Se	$4 \cdot 10^{-7}$	S_{II}	10^{-2}

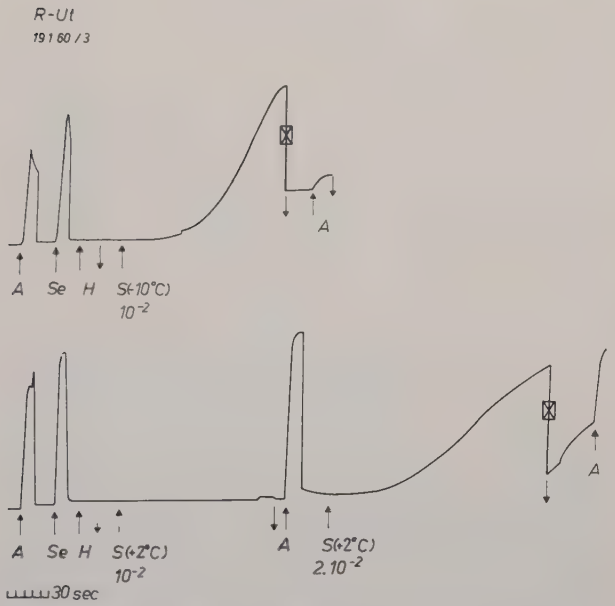


Abb. 32. Ratten-Uterus: Vergleich S (−10 °C) und S (+ 2 °C)

A	10^{-7}	S (− 10 °C)	10^{-2}
Se	10^{-7}	S (+ 2 °C)	10^{-2}
H	$2 \cdot 10^{-5}$	S (+ 2 °C)	$2 \cdot 10^{-2}$

reihe wurde S_{II} −10 °C mit S_{II} +2 °C vergleichend untersucht. Die gewählten S-Konzentrationen zeigen nahezu gleiche Aktivitäten, nur ist S_{II} +2 °C um die Hälfte weniger pharmakologisch aktiv (Abb. 32). Bei Vergleich entsprechender Konzentrationen von S_{II} +20 °C war eine Tonisierung auch in 8mal höheren Konzentrationen nicht mehr zu erreichen, höchstens eine Verstärkung spontaner Kontraktionen (Abb. 33).

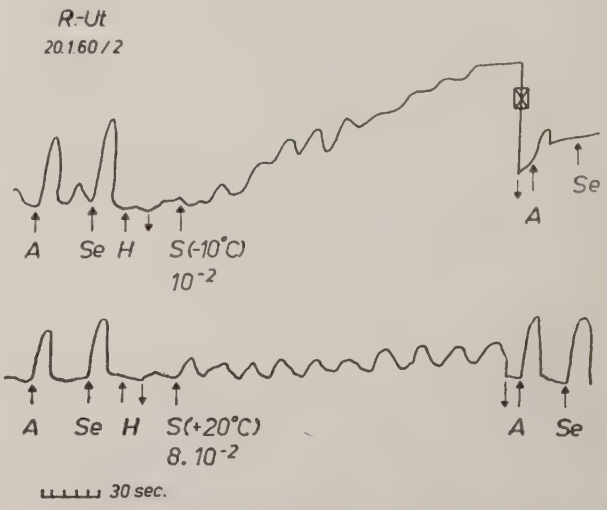


Abb. 33. Ratten-Uterus: Vergleich S (− 10 °C) und S (+ 20 °C)

A	10^{-7}	S (− 10 °C)	10^{-2}
Se	$2 \cdot 10^{-7}$	S (+ 20 °C)	$8 \cdot 10^{-2}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$		

Aus diesen Ergebnissen läßt sich annähernd ein Verhältnis der pharmakologischen Aktivität errechnen. Wenn man S lyo. = 1 setzt, ergibt sich:

S lyo.	:	S_{II} −10 °C	:	S_{II} +2 °C	:	S_{II} +20 °C
1	:	1,5	:	3	:	>12

Die Abnahme der pharmakologischen Aktivität durch Lagerung bei höherer Temperatur ist recht eindrucksvoll.

2.19 Wirkung von unbeimpftem Kulturmedium auf den Uterus

Aus der Beschreibung über die Herstellung der von uns verwendeten Staphylokokkentoxine geht hervor, daß in dem Filtrat kein Nährboden bzw. nur Spuren davon enthalten sein können. Wir unternahmen zur Kontrolle einige Versuche, um die Wirksamkeit des Kulturmediums am Uterus festzustellen. Wir verabreichten den Nährboden in volumenmäßig gleichen Konzentrationen wie S.

Ergebnisse

Am Uterus der Ratte führt das Kulturmedium 10^{-2} ml/ml sofort nach Applikation zu einer Kontraktion (Abb. 34). Diese entspricht in bezug auf ihre Stärke einer Kontraktion von $2 \cdot 10^{-7}$ Serotonin bzw. $4 \cdot 10^{-7}$ Acetylcholin. Diese Kontraktion ist gut auswaschbar und kann beliebig oft wiederholt werden. Die Ansprechbarkeit des Uterus auf Serotonin und Acetylcholin verändert sich auch nach wiederholter Gabe des Nährmediums nicht (Abb. 35, oben). Durch $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml Atropin wird die Kontraktion nicht verändert, ver-

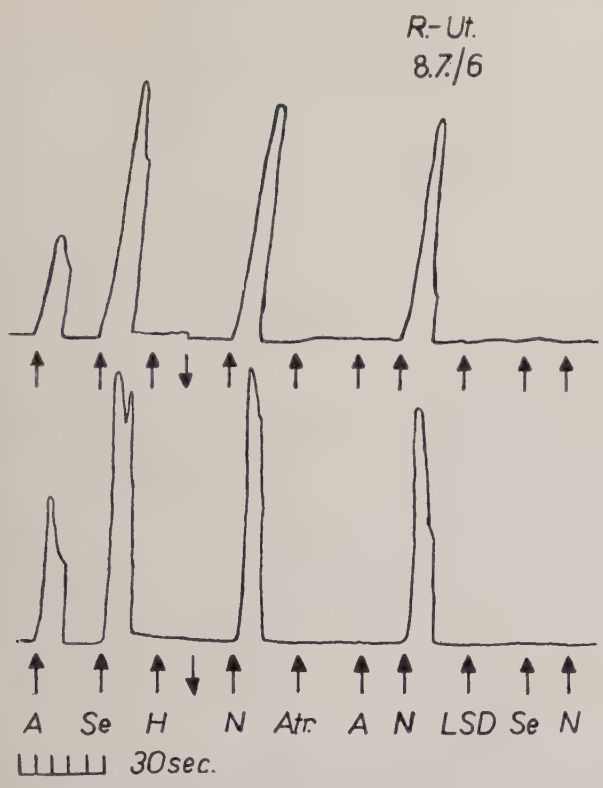


Abb. 34. Ratten-Uterus: Wirkung des Kulturmediums (N)

A	$2 \cdot 10^{-7}$	Atr.	$5 \cdot 10^{-7}$
Se	$2 \cdot 10^{-7}$	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$
H	$2 \cdot 10^{-5}$	N	10^{-2}

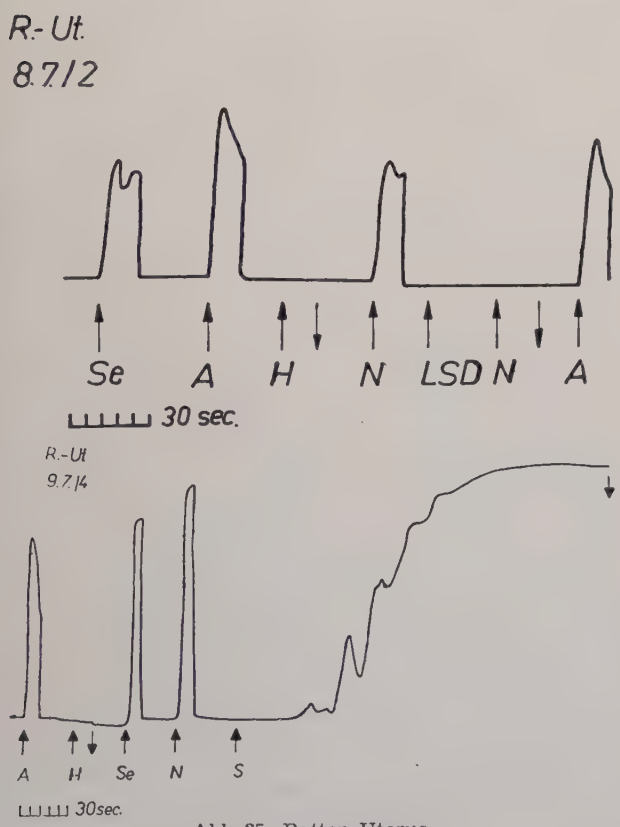


Abb. 35. Ratten-Uterus

A	$2 \cdot 10^{-7}$	N	10^{-2}
Se	10^{-7}	S	10^{-2}
H	$2 \cdot 10^{-5}$	LSD	$2 \cdot 10^{-6}$

schwindet jedoch völlig nach LSD, $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml (Abb. 34 und 35, oben).

Diese Befunde weisen darauf hin, daß die durch S ausgelöste Reaktion nicht durch den Nährboden bedingt sein kann, wie auch aus der Abbildung (35, unten) hervorgeht.

Damit beenden wir die Wirkungen von S am isolierten Ratten-Uterus. Vergleichend betrachten wir noch einige Befunde am Meerschweinchen-Uterus.

2.2 Wirkung von S auf den isolierten Uterus des Meerschweinchens

Soweit uns bekannt wurde, haben mit diesem Organ Schaaf und Robert (1937) gearbeitet, die zum Nachweis spezifischer Staphylokokkenantigene die Kontraktionskraft des Uterus von sensibilisierten Meerschweinchen als Test benutzten. Dieser Uterus ist hoch acetylcholin- und histaminempfindlich. Auf Serotonin reagiert der Meerschweinchen-Uterus auch bei Anwendung höherer Dosen kaum.

Ergebnisse

In der gleichen Anordnung wie am Ratten-Uterus führten wir mit S_I 4 Versuche am 28. 5. und 9 Versuche mit S_{II} am 14. 7. 1959 durch. Bei den Experimenten, die wir durchführten, fiel auf, daß nur weniger als 50 % der Uteri auf S heftig reagierten. Die meisten Uteri zeigten nach S nur eine geringfügige Erhöhung des Tonus. Auf der Abbildung (36) sehen wir einen Vergleich der von uns benutzten Toxine an zwei Uteri, die gut ansprachen. Die S-Wirkung ist ähnlich der am Ratten-Uterus. Nur ist die nach einer bestimmten Latenzzeit beginnende Tonuszunahme auch bei relativ

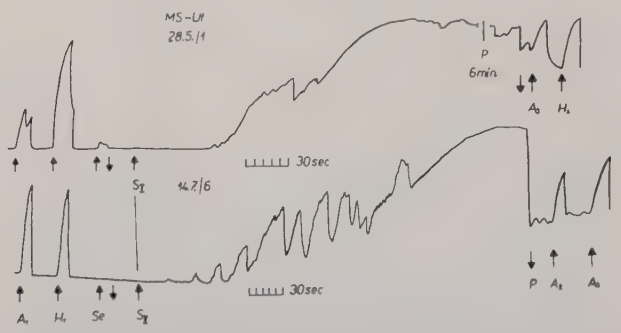


Abb. 36. Meerschweinchen-Uterus: Vergleich S_I und S_{II}

A_1	10^{-7}	H_1	$2 \cdot 10^{-7}$
A_2	$4 \cdot 10^{-7}$	H_2	10^{-6}
A_3	10^{-6}	S_I	$4 \cdot 10^{-3}$
Se	$2 \cdot 10^{-6}$	S_{II}	$4 \cdot 10^{-3}$

hohen S-Konzentrationen durch Relaxationen unterbrochen, die aber niemals das Ausgangsniveau erreichen. Im Verlauf mehrerer Minuten stellt sich dann ebenfalls eine maximale Kontraktur ein, die aber nicht so starr verläuft wie am Ratten-Uterus. Nach dem Wechsel der Badflüssigkeit erschlafft der Uterus ziemlich rasch, und die Empfindlichkeit ist nur gering reduziert. Qualitativ verhalten sich S_I und S_{II} am Meerschweinchen-Uterus gleich, quantitativ scheint S_I etwas stärker zu sein als S_{II}.

Zusammenfassung der Befunde III, 1 und 2

S führt an glattmuskulären Organen verschiedener Spezies zu einer dosisabhängigen Reaktion, die gekennzeichnet ist

a) durch die Latenzperiode zwischen Applikation des Toxins und dem Beginn der Reaktion.

Bei den Organen des Verdauungstraktes ist die Latenzzeit wesentlich kürzer (< 30 s bis 1 min) als bei Uteri von Ratten und Meerschweinchen. Während der nur kurzen Latenzperiode wurden an Abschnitten des Verdauungstraktes von Ratten kurzdauernde initiale Kontraktionen von wechselnder Intensität und nachfolgender Erschlaffung beobachtet.

b) durch eine Verkürzung des Muskels, entsprechend der Empfindlichkeit des Organs von kurzer oder langer Dauer.

Mit dieser Tonuserhöhung kann es zum Auftreten von Kontraktionen kommen, aber auch zu einer Verstärkung der Spontanmotilität. Eine Abnahme der Spontanmotilität wurde am Kaninchen-Duodenum und Hühner-Coecum beobachtet.

c) durch eine maximale oder submaximale Kontraktur, die längere Zeit bestehen bleibt, ehe wieder spontane Relaxation eintritt.

Nicht alle Organe erschlaffen auch nach häufigem Badwechsel spontan.

d) durch Reduzierung der Empfindlichkeit der Organe auf weitere Gaben Toxin oder Testsubstanzen.

Dieses Phänomen ist streng dosisabhängig, da es nur bei relativ hohen Dosen zum völligen Verlust der Empfindlichkeit kommen kann, während nach kleinen S-Gaben die normale Empfindlichkeit bestehen bleibt.

Weiter fanden wir:

e) Die Organe der Ratte reagieren auf S empfindlicher als entsprechende Organe vom Meerschweinchen.

Bei vergleichbarer S-Konzentration verlieren Organe der Ratte eher ihre Empfindlichkeit als die Organe von Meerschweinchen.

f) Eine antagonistische Beeinflussung der S-Reaktion war mit LSD, Cepentyl, Reserpin und Chlorpromazin am Uterus der Ratte möglich. Adrenalin relaxierte den durch S kontrahierten Uterus. Durch Atropin konnten wir am Meerschweinchen-Ileum eine partielle Hemmung der S-Reaktion erreichen.

g) Die S-Wirkung ist LSD-resistent am Ileum und Colon der Ratte sowie am Coecum vom Huhn und Atropin-resistent am Ileum und Uterus der Ratte.

h) S ist am Ratten-Uterus bedingt auswaschbar.

i) Erhitzte Filtrate von S sind am Uterus der Ratte ohne Wirkung.

k) Die von uns angewandten S_I und S_{II} zeigten qualitativ gleiche Wirkungen, quantitativ erschien S_{II} etwas schwächer als S_I.

l) Die pharmakologische Aktivität von S steht in enger Beziehung zur Lagerungstemperatur.

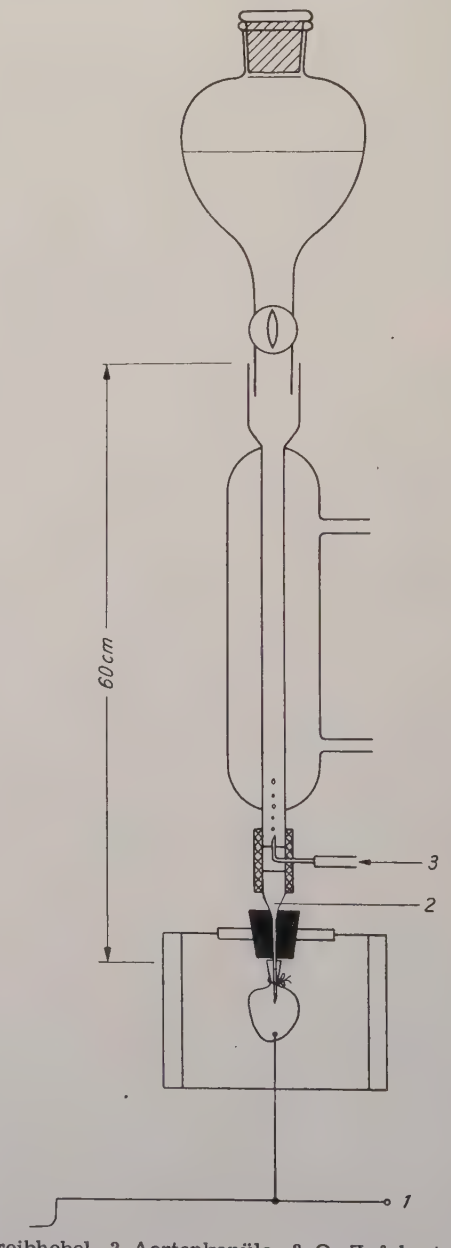
3. Die Wirkung von Staphylolysin auf andere isolierte Organe verschiedener Spezies

3.1 Wirkung von S auf isolierte Herzen

Über die Wirkungen von Staphylokokkentoxin an isolierten Herzen liegt keine Literatur vor. Einige Arbeiten von Stolmakova (1954, 1957) befassen sich mit der Wirkung von Staphylokokkenenterotoxin an isolierten Katzenherzen nach der Langendorff-Methode. Genügend hohe Dosierung des Enterotoxins führte nach einer Latenzperiode zu einer langsamen Abnahme der Herzamplitude und zum diastolischen Herzstillstand.

Unsere Untersuchungen an isolierten Herzen führten wir an drei unterschiedlichen Spezies durch, nämlich an Säugern (Kaninchen), Vögeln (Huhn) und Mollusken (Helix pomatia).

3.11 Wirkung von S auf das Herz von Kaninchen (mit Methodik)



1 Schreibhebel, *2* Aortenkanüle, *3* O_2-Zufuhr + 5% CO_2

Obgleich das Prinzip der Methode zur Untersuchung isolierter Herzen nach LANGENDORFF als bekannt vorausgesetzt werden darf, soll unsere Methodik doch Erwähnung finden, da wir diese in ihrer Einfachheit bisher nicht in der Literatur erwähnt fanden.

Methodik

In der Operationstechnik haben wir uns eng an die von BURN angegebene Anordnung gehalten und entnahmen das Herz aus dem eröffneten Brustkorb des Kaninchens (2000 bis 3000 g). Nach Ausspülen des Blutes aus dem Herzen mit erwärmter Tyrodelösung, die Glukose in doppelter Menge enthielt, wurde in die Aorta eine Kanüle eingebunden und das Herz in einer temperierten Kammer dem Perfusionssystem angeschlossen. Temperatur (38 °C), Druck (60 cm H_2O) und Carbogenierung der Tyrodelösung wurden konstant gehalten. In dieser Anordnung fließt aus dem oberen geschlossenen Kolben immer nur soviel Tyrodelösung nach, wie durch das Herz unten abfließt. Einzelheiten der Apparatur gehen aus der Zeichnung hervor.

Wir benutzten für die Untersuchungen wieder beide Staphylolysine. Vom 17. 3. bis 7. 5. 1959 führten wir 16 Versuche mit S_I und vom 2. 7. bis 25. 8. 1959 mit S_{II} 23 Versuche durch. In jeder Versuchsreihe sprachen 3 Herzen auf S nicht an.

Ergebnisse

Wir stellen die mit beiden Chargen erhobenen Befunde nebeneinander. Bei Verabfolgung von 10^{-2} ml/ml S in die Aortenkanüle kommt es nach etwa 1 min zu einer Vergrößerung der Amplitude. Die Schlagfrequenz des Herzens nimmt dabei zu (Abb. 37). Nach einigen Minuten normalisieren sich die Amplitude und die Frequenz. Das Herz reagiert noch auf weitere Gaben S. Bei Erhöhung der Dosis auf $5 \cdot 10^{-2}$ ml/ml S findet sich nach etwa 1 min zunächst eine Abnahme der Amplitude und dann eine Zunahme (Abb. 38). Diese Amplitudenvergrößerung ist je nach Empfindlichkeit und Ansprechbarkeit des Herzens sehr eindrucksvoll. Allmählich kommt es dann zur Abnahme der Amplitude und zum eventuellen Herzstillstand. Schlägt das Herz mit kleiner Amplitude weiter, ist es meist unempfindlich auf weitere Toxingaben bzw. kommt erst nach einer Weile zum Stillstand. Die Applikation noch größerer Mengen S_{II} (Abb. 39) führt qualitativ zu noch heftigeren Reaktionen, bei denen es meist zum Herzstillstand kommt. Dieser ist von systolischer Art (Abb. 40). Vergleicht man S_I und S_{II}, so ist ersichtlich, daß diese Chargen quantitativ und qualitativ als übereinstimmend angesehen werden können. Die in einigen Versuchen abgebildete Wirkung des Kulturmediums (39, 40) ist deutlich von der S-Wirkung unterschieden.

Zusammenfassend finden wir, daß S eine ausgesprochene positiv inotrope Wirkung zeigt, die bei höheren Dosen in eine negativ inotrope Wirkung übergeht. Große Mengen von S lassen das Herz in der Systole stillstehen. S-Dosen unter 10^{-2} sind allgemein ohne Effekt.

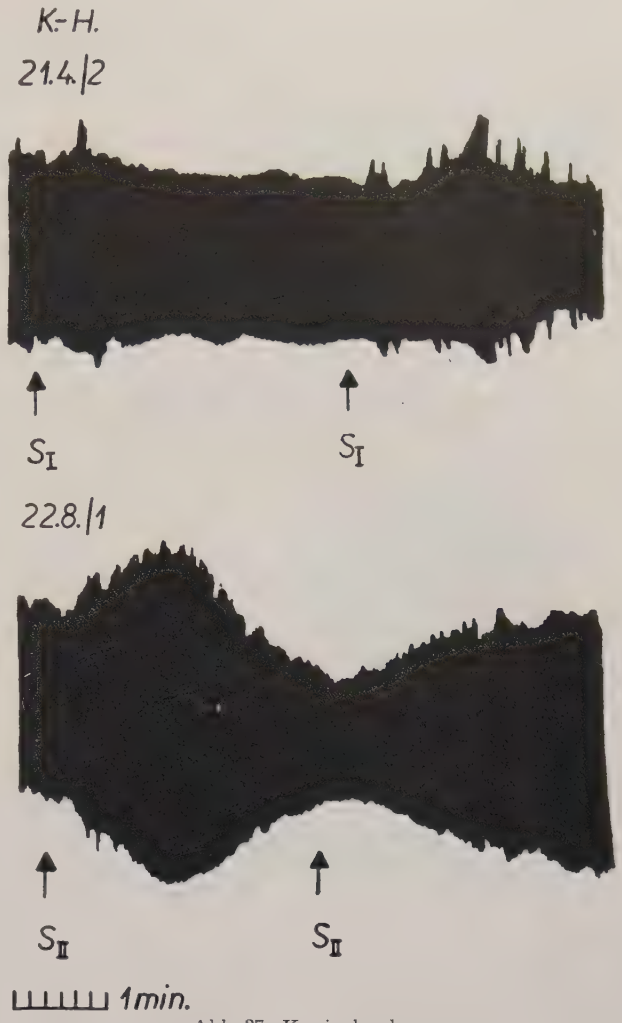


Abb. 37. Kaninchenherz
S_I 10^{-2} S_{II} 10^{-2}

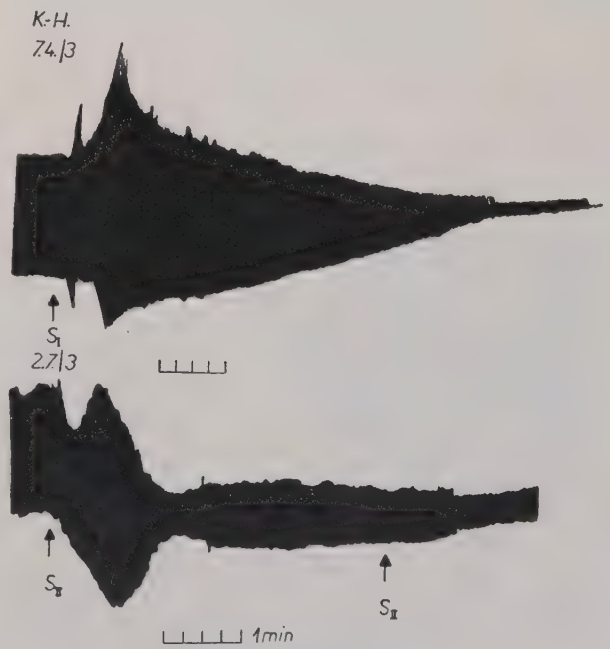


Abb. 38. Kaninchenherz
S_I $5 \cdot 10^{-2}$ S_{II} $5 \cdot 10^{-2}$

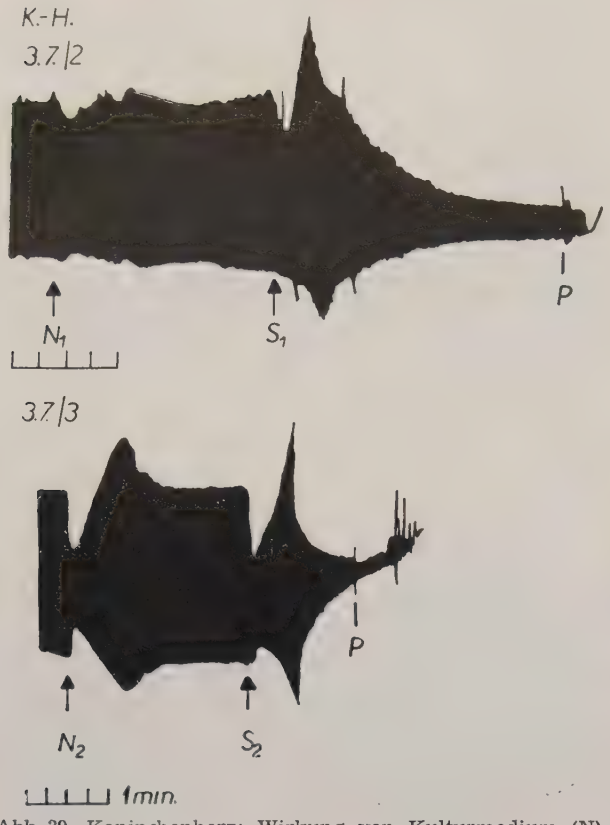


Abb. 39. Kaninchenherz: Wirkung von Kulturmedium (N) und S

N_1 10^{-1} S_1 10^{-1}
N_2 $5 \cdot 10^{-1}$ S_2 $5 \cdot 10^{-1}$

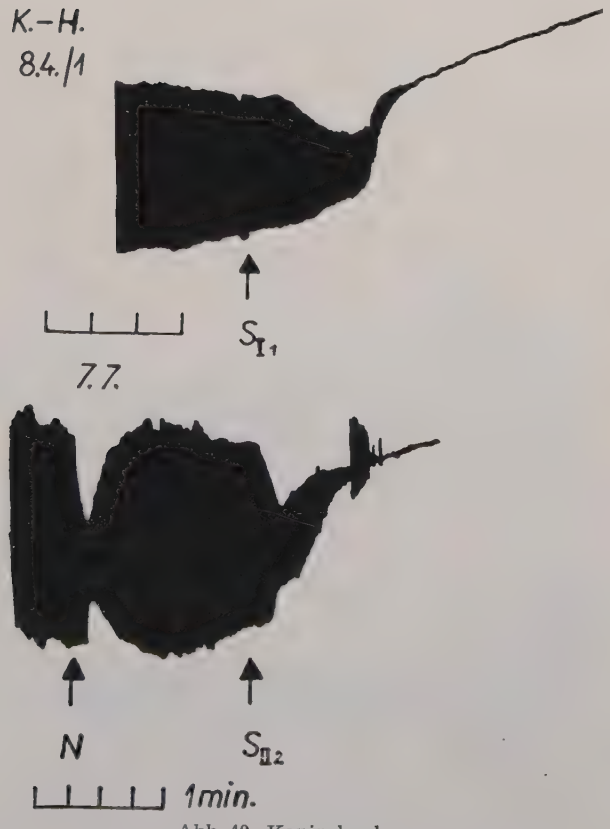


Abb. 40. Kaninchenherz

N $5 \cdot 10^{-2}$ S_{II} $5 \cdot 10^{-1}$
S_I $5 \cdot 10^{-2}$

3.12 Wirkung von S auf das Herz von Hühnern

Mit der gleichen Methode, wie angegeben, untersuchten wir den Einfluß von S auf 4 Hühnerherzen in der Zeit vom 23. 4. bis 1. 6. 1959. Dosen von 10^{-2} ml S_I führten unmittelbar nach Verabreichung zu einer kurz anhaltenden Vergrößerung mit nachfolgender Verkleinerung der Amplitude und Frequenzabnahme bis zum systolischen Herzstillstand (Abb. 41).

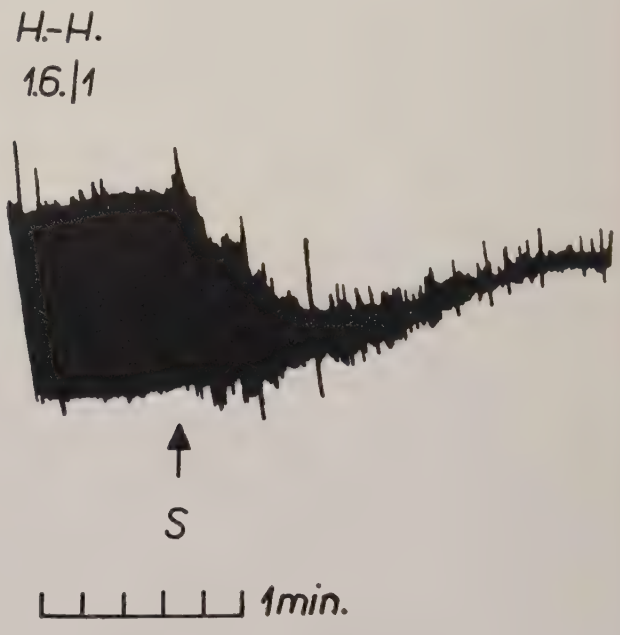


Abb. 41. Hühnerherz

S 10^{-2}

3.13 Wirkung von S auf das Herz von Helix pomatia

Das Herz von Helix pomatia wurde in unsere Untersuchungen einbezogen, da dieses Organ, wie viele Molluskenherzen, hochempfindlich auf Serotonin und Acetylcholin ist (Erspamer und Ghiretti, 1951; Zetler und Schlosser, 1954; Gaddum und Paasonen, 1955). Histamin, Adrenalin und Noradrenalin sind am Helixherzen unwirksam. Wir führten mit S im Juli 20 Versuche durch nach der Methode der oben zitierten Autoren. Wir registrierten die Kontraktionen mit einem tangential schreibenden Strohhalm. Die Vergrößerung betrug 1 : 20. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 6,5 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$ ad 1000 ml aq. dest.

Ergebnisse

Die Serotoninwirkung am Helixherzen ist durch einen exzitatorischen Mechanismus, eine positiv inotrope Wirkung, charakterisiert. Wir nahmen eine Dosis/Wirkungskurve von Serotonin auf (Abb. 42, oben) und prüften vergleichend den Einfluß des Kulturmediums (Abb. 42, unten links). S in Mengen von $5 \cdot 10^{-2}$ ml/ml war ohne Effekt (Abb. 42, unten rechts), während das Kulturmedium sich ähnlich wie Serotonin verhielt. Eine antagonistische Wirkung von LSD auf Serotonin besteht an diesem Präparat nicht. Die Effekte des Nährbodens ließen sich nicht hemmen.

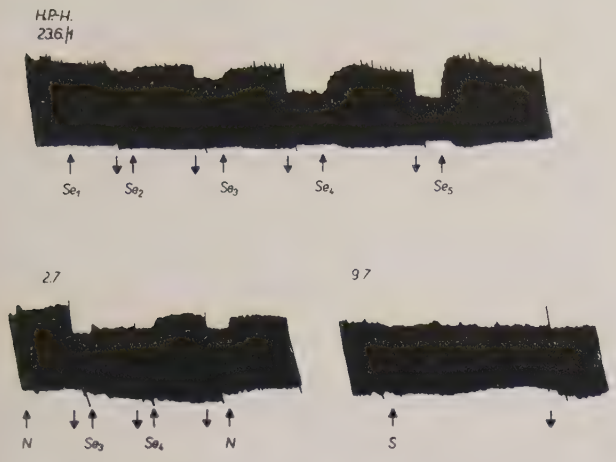


Abb. 42. Herz von Helix pomatia

oben: Dosis/Wirkung von Serotonin 1,5 bis $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml

unten links: Vergleich Serotonin/Kulturmedium

N	$5 \cdot 10^{-2}$	unten rechts:
Se_3	$5 \cdot 10^{-7}$	S $5 \cdot 10^{-2}$
Se_4	10^{-6}	

3.2 Wirkung von S auf Herzvorhofstreifen (mit Methodik)

In Kenntnis der S-Wirkung an isolierten Herzen interessierte uns der Einfluß von S auf den Vorhof. Herzvorhofstreifen von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten wurden in ihrem Verhalten gegenüber S geprüft. Toxine wurden bisher in dieser Versuchsanordnung noch nicht untersucht.

Methodik

Die Versuchsanordnung für Kaninchen-Herzvorhofstreifen ist ausführlich in der „Practical Pharmacology" von Burn beschrieben worden. Als Nährlösung benutzten wir eine Tyrodelösung ohne $MgCl_2$. Die Herzstreifen wurden in temperierten (29 °C) Gefäßen gehalten. Die Kontraktionen wurden mit einem Tangentialschreiber von geringem Gewicht im Verhältnis 1 : 10 auf einen berußten Kymographen geschrieben. Vor Versuchsbeginn waren die Herzstreifen 90 min unbeeinflußt gelassen worden. Im Verlauf des Experiments, aber auch schon während der Präparation, war für kräftige Sauerstoffzufuhr gesorgt. Das Herzvorhofpräparat ist empfindlich auf Acetylcholin, Histamin und Adrenalin. Differenzen bei der Präparation der Herzvorhofstreifen verschiedener Spezies sind nicht vorhanden.

In der Zeit vom 30. 9. bis 4. 12. 1959 führten wir Versuche mit Herzstreifen von 24 Kaninchen (2000 bis 3000 g), 14 Meerschweinchen (etwa 400 g) und 6 Ratten (250 g) durch. Die wirksame S-Dosis betrug 10^{-2} ml/ml. Es wurde nur S_{II} gegeben.

Ergebnisse

Wenn man die Kontraktionen des Herzvorhofstreifens 90 min nach Präparation registriert, erhält man eine gleichmäßige Amplitude, die im Verlauf von 120 min nahezu unverändert ist. Als Beispiel sind in der Abbildung (43) die Kontraktionen eines Herzvorhofstreifens von Ratte und Kaninchen aufgezeichnet.

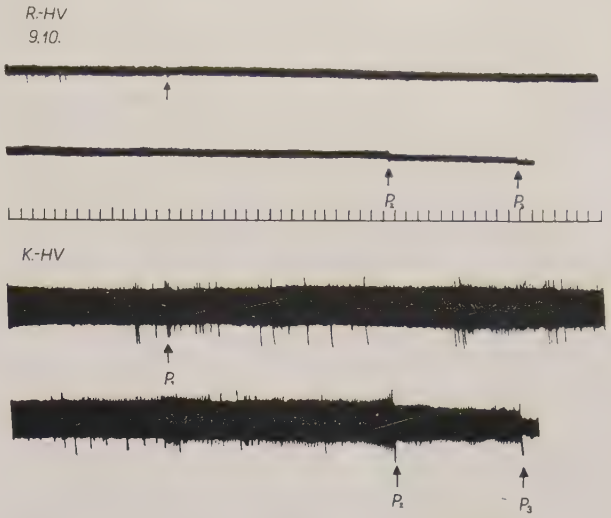


Abb. 43. Herzvorhofstreifen

oben: von der Ratte; unten: vom Kaninchen

P_1	10 min	Kymographenstopp
P_2	15 min	
P_3	60 min	

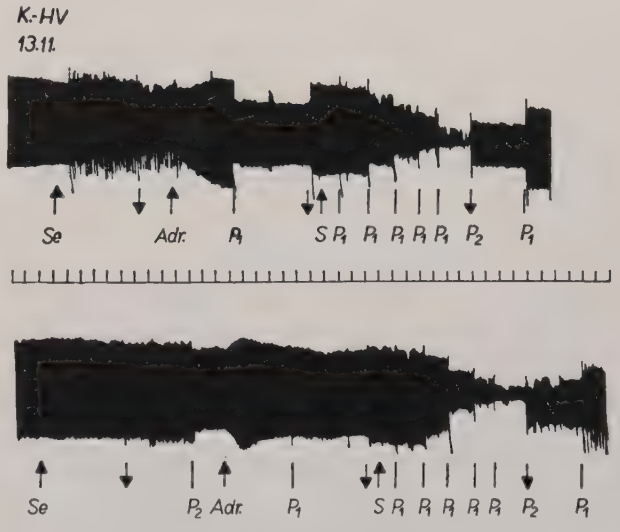


Abb. 44. Herzvorhofstreifen von Kaninchen

Se	10^{-7}	P_1	5 min
Adr.	$2 \cdot 10^{-7}$	P_2	10 min
S	10^{-2}		Kymographenstopp

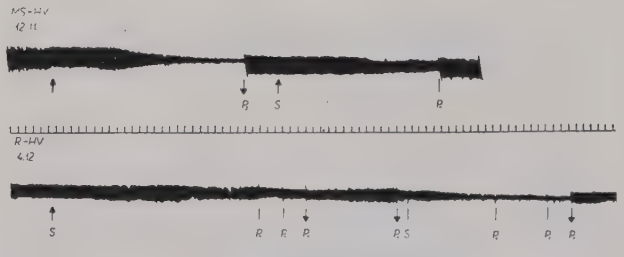


Abb. 45. Herzvorhofstreifen

oben: vom Meerschweinchen; unten: von der Ratte

P_1	10 min	Kymographenstopp
P_2	20 min	
S	10^{-2}	

3.21 Wirkung von S auf das Herzvorhofpräparat des Kaninchens

Das Herzvorhofpräparat von Kaninchen reagiert in 50 % der durchgeführten Versuche nicht auf S. Bei den S-sensitiven Herzstreifen kommt es nach einer Latenzperiode von 20 min zu einer Verkleinerung der Amplitude (Abb. 44). Diese kann im Verlauf von 30 min nach der Applikation 15 bis 20 % der Ausgangsamplitude betragen. Nach Wechsel des Bades und kräftigem Spülen verschwindet die Wirkung schnell, und das Präparat ist für weitere S-Gaben ansprechbar. Während Adrenalin $2 \cdot 10^{-7}$ g/ml eine mäßige Amplitudenvergrößerung hervorruft, hat Serotonin in der gleichen Menge nur sehr geringe positive inotrope Effekte.

3.22 Wirkung von S auf das Herzvorhofpräparat des Meerschweinchens

Das Herzvorhofpräparat von Meerschweinchen zeigt sich auf S empfindlicher. Nur 20 % der Präparationen reagieren nicht auf S. Die Latenzzeit bis zum Eintreten der S-Wirkung ist kürzer (Abb. 45, oben), diese entspricht etwa der Hälfte der Latenzzeit, die beim Vorhofstreifen von Kaninchen beobachtet wird. Auch am Meerschweinchenvorhof kommt es zu einer langsamen Abnahme der Hubhöhe, die nach Spülung wieder völlig verschwindet. Mehrmalige Applikation von S ist effektiv.

3.23 Wirkung von S auf das Herzvorhofpräparat der Ratte

Das Herzvorhofpräparat der Ratte verhält sich ähnlich wie der Vorhofstreifen von Meerschweinchen: Latenzzeit und Eintritt der S-Wirkung mit Amplitudenverkleinerung (Abb. 45, unten). Dieser Zustand kann, wenn nicht gespült wird, längere Zeit anhalten. Mehrere Gaben von S sind wirksam.

Betrachtet man die oben demonstrierten Kurvenbilder genau, so kann man an manchen Präparaten eine ganz schwache, oft nur leicht angedeutet, positiv inotrope Wirkung sehen (Kaninchen Abb. 44 untere Kurve, Meerschweinchen und Ratte Abb. 45). In der folgenden Abbildung (46) hatte S an Herzvorhofstreifen von Kaninchen und Meerschweinchen nur positiv inotrope Effekte, die ziemlich stark ausgebildet waren. Am Meerschweinchenpräparat gingen diese später in eine negativ inotrope Phase über.

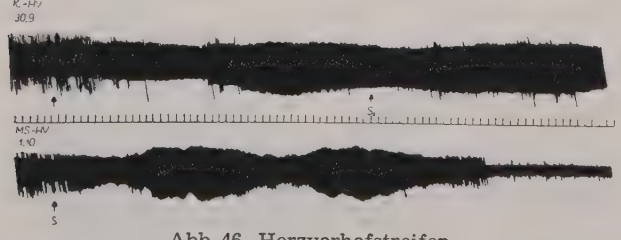


Abb. 46. Herzvorhofstreifen
oben: vom Kaninchen; unten: vom Meerschweinchen
S_1 10^{-2} S_2 $2 \cdot 10^{-2}$

3.3 Wirkung von S auf die Gefäße des isolierten Kaninchenohres (mit Methodik)

Gefäßwirkungen von S sind in dieser Anordnung bisher noch nicht studiert worden. Bei der Perfusion von Meerschweinchen- und Katzenlungen (Feldberg und Keogh) sowie bei der Durchströmung von Lunge und Leber des Hundes (Feldberg und Kellaway) wurde dem ausströmenden Perfusat Beachtung geschenkt, weniger dem Verhalten der Gefäße dieser Organe. Feldberg konnte nachweisen, daß durch das Toxin aus Lungen und Leber Histamin, das er biologisch bestimmte, freigesetzt wird. Diese Freisetzung beginnt nach einer Latenz von etwa 20 min nach der Applikation von S.

Methodik

Wir benutzten die klassische Anordnung, wie sie von Krawkow/Pisemski angegeben wurde. Die Versuche wurden bei 37 °C durchgeführt, als Perfusionsflüssigkeit diente Tyrodelösung. Vor Beginn des Versuches wurde das Ohr 20 min lang durchströmt. Die Applikation der Substanzen bzw. des Toxins erfolgte in die Arterienkanüle (0,5 ml Volumen in 20 s). Die abtropfende Flüssigkeitsmenge wurde über einen freischwingenden Hebel geleitet. Bei jedem Tropfen, der auf den Hebel fiel, wurde durch Kontakt ein Stromstoß ausgelöst und dieser auf einen Ordinatenschreiber nach Fleisch übertragen (Abnahme der Ordinate bedeutet geringere Tropfenfolge). Das Präparat spricht auf Acetylcholin und Histamin mit einer Erhöhung der Tropfenzahl, auf Adrenalin und Serotonin (Wilhelmi und Schindler, 1959) mit einer Erniedrigung der Tropfenfrequenz an. Insgesamt prüften wir in 9 Versuchen vom 23. 11. bis 3. 12. 1959 die Wirkung von S.

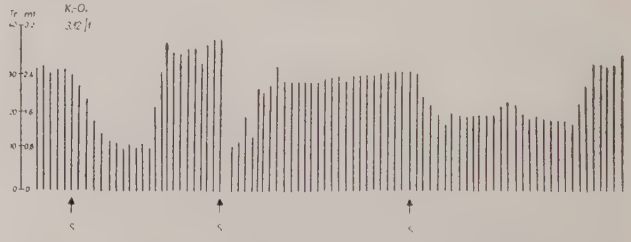


Abb. 47. Gefäßpräparat-Kaninchenohr
(Registrierung der Tropfenfrequenz für je 30 s)
S $5 \cdot 10^{-3}$

Ergebnisse

S-Konzentrationen unter $2 \cdot 10^{-3}$ ml haben nur geringe Wirkung. $5 \cdot 10^{-3}$ ml S führt nach einer Latenzzeit von 30—60 s zu einer Abnahme der Tropfenzahl (Abb. 47). Eine Normalisierung des Durchflusses zeigt sich nach mehreren Minuten. Die Anwendung dieser Dosis mehrmals hintereinander führt qualitativ und quantitativ zu den gleichen Effekten. Die Verabreichung höherer S-Konzentrationen, 10^{-1} ml, führt unmittelbar zum Verschwinden der Ausflußmenge (Abb. 48). Nach 30 min wird der Ausfluß nur langsam wieder normal. Eine 5fach höhere S-Konzentration ist noch schwach wirksam. Adrenalin, 10^{-5} g/ml, hat keine Wirkung mehr. Zunehmende Ödembildung führte zur Begrenzung der Untersuchungsdauer.

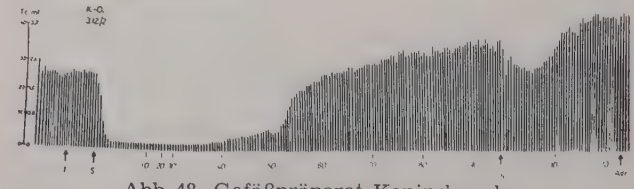


Abb. 48. Gefäßpräparat-Kaninchenohr
T 0,2 ml Tyrodelösung
S_1 10^{-1}
S_2 $5 \cdot 10^{-1}$
Adr. 10^{-5}
10′, 20′ = min nach Applikation

Zusammenfassung der Befunde III, 3

Die S-Wirkung am isolierten Herzen von Kaninchen und Hühnern setzt wenige Sekunden nach Applikation ein. Wir finden eine positivinotrope und chronotrope Wirkung nach S-Gabe. Höhere Dosen führen zu stärkeren Reaktionen, denen eine allmähliche Abnahme der Amplitude folgt bis zum evtl. systolischen Herzstillstand. Die S-Wirkung ist dosisabhängig und reversibel in einem bestimmten Dosisbereich. Das Herz von Helix pomatia reagiert nicht auf S.

An Herzvorhofstreifen von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten kommt es bei Gaben von S nach einer Latenzzeit von mehreren Minuten zu einer vorübergehenden positiv inotropen Wirkung, die allmählich in eine negativ inotrope Wirkung übergeht. Die S-Reaktion ist reversibel, Vorhöfe von Meerschweinchen reagieren empfindlicher auf S als andere.

An den Gefäßen des Kaninchenohres zeigt S eine dosisabhängige Reaktion. Es kommt wenige Sekunden nach der S-Gabe zu einer Verminderung der Ausflußmenge für mehrere Minuten. Diese Reaktion ist reversibel. Erst höhere S-Dosen reduzieren die Empfindlichkeit auf weitere Toxingaben.

IV. Zur Toxizität von Staphylokokkentoxin

Toxische Wirkungen von S haben wir schon in unseren Versuchen an den isolierten Organen beobachten können. Der Verlust der Empfindlichkeit verschiedener Organe nach sehr hohen Dosen S sowie auch der systolische Herzstillstand können als Ausdruck einer Schädigung durch das Toxin angesehen werden. Unter den toxischen Eigenschaften des Staphylokokkentoxins versteht man, abgesehen von der dermonekrotischen, die letale und hämolytische Fähigkeit (v. Heyningen). Zur Feststellung der Aktivität eines Toxins bedient man sich dieser Eigenschaften. Es gibt eine Reihe von Methoden, diese meßbar zu machen. Die Mannigfaltigkeit der Methoden jedoch, ihre Unzulänglichkeit insbesondere durch Anwendung subjektiver Verfahren lassen es fast unmöglich erscheinen, nicht nur die verschiedenen Eigenschaften eines Toxins zu vergleichen, sondern erschweren darüber hinaus die Bewertung gleicher Eigenschaften verschiedener Toxine.

Im Zusammenhang mit der Feststellung der pharmakologischen Aktivität von S waren wir bemüht, auch das letale und hämolytische Vermögen von S kennenzulernen. Dabei bedienten wir uns einfacher objektiver Methoden.

1. Die letale Wirkung von Staphylolysin

Einleitung und Methodik

Schon seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, daß Staphylokokkenfiltrate bei intravenöser Applikation Kaninchen, Mäuse und auch andere Tiere töten können. Von Staphylokokkentoxinen, die Kaninchen schon nach 5 Minuten töteten, berichtet Burnet (1929, 1930). Mäuse sterben innerhalb von 3 Tagen nach intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation von Staphylokokkentoxin (Hartley und Llewellyn-Smith, 1934). Wittler und Pillemer (1948) stellten ein stark wirksames Staphylokokkentoxin her, das eine LD_{50} von $1{,}2 \cdot 10^{-7}$ g/Maus zeigte. Die Versuche führten diese Autoren vornehmlich mit α-Toxin durch, das ebenso für Kaninchen letal wirkt. Die anderen Komponenten von S, β- und γ-Toxin, sind wohl für Kaninchen tödlich, jedoch nicht für Mäuse und Meerschweinchen (Llewellyn-Smith und Price, 1938).

Wir untersuchten die Wirkungsbedingungen des letalen Faktors von S, weil wir wissen wollten, ob letale und pharmakologische Aktivität miteinander korrelieren oder nicht.

Methodik

Die Bedingungen der letalen Wirkung von S studierten wir an weißen Mäusen bei konstanter Temperatur und Standardkost. Nachdem wir in Vorversuchen den Dosisbereich ermittelt hatten, in dem die Tiere starben, nahmen wir jedesmal 25–50 Mäuse in 5 Gruppen in den Versuch. Alle Tiere waren von ungefähr gleichem Körpergewicht (± 1 g vom Durchschnittsgewicht); das Durchschnittsgewicht der 5 Gruppen untereinander war gleich. Die Tiere erhielten in jeder Gruppe eine bestimmte Menge S. Die applizierten Dosen waren logarithmisch durch einen Faktor (1,5 und weniger) verbunden. S wurde ausschließlich intravenös (i.v.) appliziert.

Obgleich Hartley und Llewellyn-Smith bei Serumprüfungsmethoden zur Feststellung des Antikörpertiters in gleicher Weise die intraperitoneale wie die intravenöse Gabe von Staphylokokkentoxin anwenden, ist nach den Arbeiten von Stoufer und Paine (1957) am Kaninchen und nach Hava und Mraz (1958) an Mäusen die intraperitoneale Gabe mit einem Fehler von 20% behaftet, d. h. nur ein Teil der Injektion gelangt ins Cavum peritonei, der Rest geht in den Darm, ins Retroperitoneum usw.

Nach i.v. Verabreichungen des Toxins wurden die Tiere in der ersten Stunde, dann in der 2.–4. Stunde beobachtet und die Sterblichkeit registriert. Da die Mortalität nach S bis zum 3. Tage noch zunehmen kann, beobachteten wir die Mäuse in einigen Versuchen bis zu 10 Tagen nach der Applikation des Toxins.

Für die Bestimmung der LD_{50} benutzten wir die Methode von Litchfield und Willcoxon (1949) und berechneten die Sicherungsgrenzen für $p = 0{,}95$. Die Bestimmung der relativen Toxizität bei Vergleich verschiedener Staphylolysine setzt die Parallelität der Dosis/Sterblichkeitskurven voraus und wurde graphisch und rechnerisch sichergestellt. Ein Schema für den Rechnungsgang wird unter 1.5 angegeben.

Staphylolysin kam in verschiedenen Chargen zur Anwendung, nämlich S_I und S_{II} als Filtrat. Dazu benutzten wir im Vergleich mit S_{II} das lyophilisierte Produkt (S lyo), dessen Ampulleninhalt in 1 ml aq. dest. gelöst wurde. S_I wurde bei -10 °C aufbewahrt, ebenso S lyo. S_{II} wurde bei -10 °C und außerdem bei $+2$ °C und $+20$ °C über mehrere Monate gelagert. Die Mengenangaben des Toxins sind in ml/g Tier angegeben.

An Mäusen benutzten wir vornehmlich die von der Farm Bioveta, in einem Versuch von der Farm Konarovice. Meist kamen weibliche Tiere (12–20 g) in den Versuch, für vergleichende Untersuchungen nahmen wir männliche Mäuse (15–20 g) von beiden Farmen.

Die Versuche zur Feststellung der Suszeptibilität verschiedener Spezies auf S wurden an Ratten und Meerschweinchen von der Bioveta-Farm ausgeführt.

1.1 Das Vergiftungsbild nach S-Applikation

Die Stärke der S-Intoxikation ist dosisabhängig, jedoch bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen sehr ähnlich. Hohe Dosen führen bei sehr empfindlich reagierenden Tieren schon während der i.v. Gabe zum Exitus. Häufiger jedoch zeigen die Tiere wenige Sekunden bis Minuten nach Applikation unkoordinierte Laufbewegungen; sie fallen auf die Seite, Krämpfe treten an den Vorder- und Hinterextremitäten auf. Die Extremitäten werden weit ausgestreckt, und Schnappatmung tritt auf. In diesem Zustand kommen die Tiere innerhalb weniger Minuten zum Exitus.

Bei anderen Tieren sind die Vergiftungsbilder schwächer ausgeprägt. Die Tiere schwanken beim Laufen hin und her, dabei werden insbesondere die Hinterextremitäten (schlaffe Lähmung) nachgezogen. Auch diese Tiere erholen sich meist nicht und sterben im Verlauf einiger Stunden. Doch auch noch nach Tagen wird Absterben beobachtet. Die Tiere, die zum Exitus kommen, machen mit ihrem gesträubten und feuchten Fell schon lange vorher einen geschwächten Eindruck.

Verfolgt man den Wert der LD_{50} nach S-Applikation, so sieht man eine Zunahme der Mortalität in den meisten Fällen nur bis zum 3. Tag (Abb. 49). Dieses

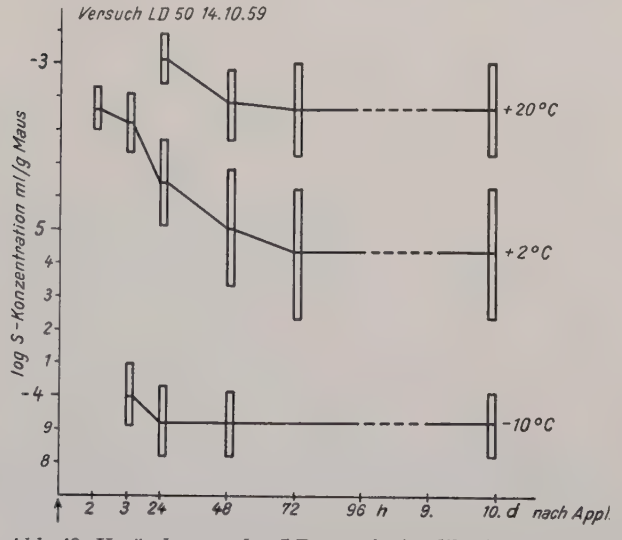


Abb. 49. Veränderung der LD_{50} nach Applikation von S in Abhängigkeit von der Zeit (mit Angabe der Streuungsbereiche)

Bei ↑ erfolgte Applikation von S, das bei −10 °C bzw. +2 °C und +20 °C gelagert war

Abszisse: Zeit in Stunden bzw. Tagen nach Applikation

Ordinate: log S-Konzentration in ml/g Maus

Verhalten zeigt S unabhängig von der Lagerungstemperatur. Obgleich auch noch nach dem 3. Tag einige Mäuse sterben können, verändert sich der Wert für die LD_{50} nicht mehr signifikant. Diese Feststellung gilt für alle von uns untersuchten S-Chargen. Somit halten wir den am 3. Tag ermittelten LD_{50}-Wert als ausreichend für vergleichende Untersuchungen.

1.2 Der Einfluß von Lagerungsdauer und -temperatur auf die letale Wirkung der Staphylolysine

Die letale Wirkung der Staphylolysine im Verlauf einiger Monate bei verschiedener Lagerungstemperatur eingehend zu untersuchen, war im Zusammenhang mit unseren pharmakologischen Experimenten wichtig. Mit zunehmendem Alter zeigen die Toxine S_I und S_{II} eine Abnahme ihrer letalen Wirkung, während lyophilisiertes S seine Aktivität im Laufe von 2 Monaten nicht verändert (Abb. 50). Der Wirkungsverlust ist besonders deutlich bei S_{II}, das bei +2 °C und +20 °C gelagert hatte. Während bei den bei −10 °C aufbewahrten Filtraten die Abnahme der letalen Wirkung von Monat zu Monat nur sehr langsam fortschreitet, ist

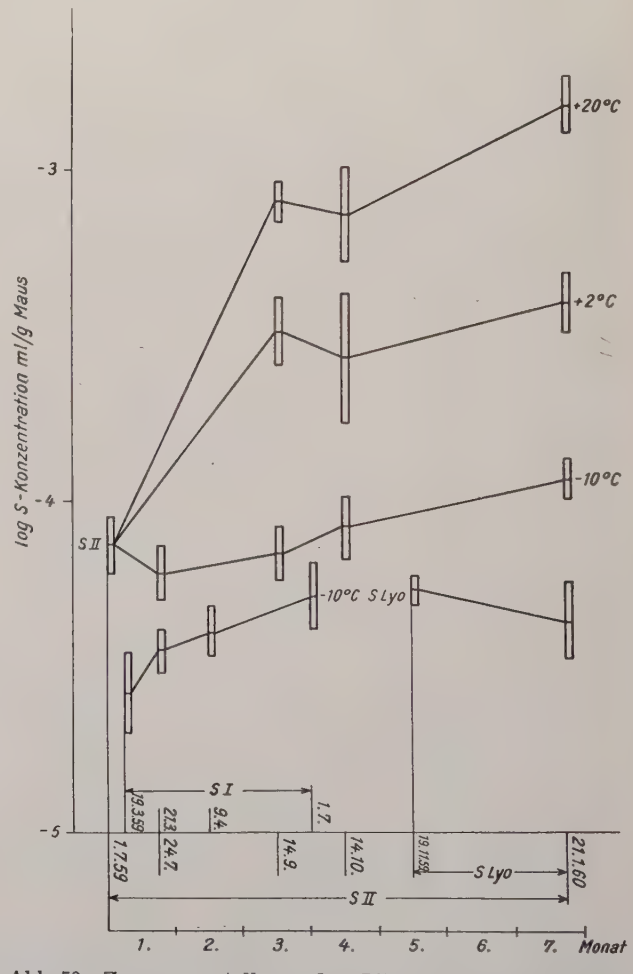


Abb. 50. Zusammenstellung der LD_{50} von verschiedenen Staphylolysinen in Abhängigkeit von Lagerungsdauer und -temperatur (mit Angabe der Streuungsbereiche)

Abszisse: Lagerdauer für

S_I vom 19. 3. 59 bis 1. 7. 59 gelagert bei −10 °C

S_{II} vom 1. 7. 59 bis 21. 1. 60 gelagert bei −10 °C bzw. +2 °C und +20 °C

S lyo. vom 19. 11. 59 bis 21. 1. 60 gelagert bei −10 °C

Ordinate: log S-Konzentration in ml/g Maus

bei den bei höherer Temperatur gelagerten Filtraten der Wirkungsverlust in den ersten beiden Monaten nach der Herstellung besonders eminent. In vergleichbaren Versuchen ist bei −10 °C gelagertes Toxin immer signifikant stärker letal wirksam als Toxin, das bei

höherer Temperatur aufbewahrt wurde. Auch zwischen den Proben, die bei +2 °C und +20 °C lagerten, ist unter vergleichbaren Bedingungen die letale Effektivität signifikant unterschieden. Im Hinblick auf die Konzentration liegt bei +2 °C gelagertes Toxin in seiner letalen Wirkung eine halbe Zehnerpotenz, bei +20 °C gelagertes über eine Zehnerpotenz höher als das S, das in gefrorenem Zustand (−10 °C) über ein halbes Jahr lang aufgehoben wurde. Stärkste Aktivität fanden wir bei S_I; S_{II} war schwächer letal, während lyophilisiertes S wirkungsmäßig in der Größenordnung von S_I lag.

Die unterschiedliche Wirksamkeit der verschiedenen Staphylolysine, wie sie auf der Abb. 50 dargestellt ist, ist nur dann statistisch vergleichbar, wenn die Versuche mit gleichem Tiermaterial am gleichen Tag durchgeführt wurden. Die Art der Darstellung täuscht in einigen Fällen eine Signifikanz nur vor, da die Streuungsbereiche der einzelnen LD_{50} weit auseinanderliegen.

Gleiche Befunde mit S_{II} erhält man, wenn man die Geschwindigkeit des Absterbens der Tiere in Relation zum Alter des Toxins betrachtet.

Nach Applikation von frischen Chargen ist die Absterbegeschwindigkeit sehr groß. 50 % der in den Versuch genommenen Tiere sterben innerhalb von 4 Stunden. Im Verlauf von 3 Wochen verändert sich zwar der Wert der LD_{50} bei dem bei −10 °C gelagertem S nur wenig, das Absterben findet sich jedoch erst in der 12.—24. Stunde post inj. Entsprechende Versuche nach 5 Monaten mit dem gleichen Filtrat lassen das gleiche Phänomen erkennen. Erst nach dieser Zeit ist in den Versuchen das Absterben der Mäuse noch mehr verlangsamt, d. h. entweder sterben überhaupt weniger als 50 % der Versuchsmäuse oder wenn schon 50 % der Tiere sterben, dauert das Absterben mehrere Tage (siehe auch Abb. 55).

Die Absterbegeschwindigkeit verändert sich ebenfalls in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur des S. Wird diese Temperatur erhöht, so nimmt der Anteil der in den ersten Stunden nach S-Intoxikation sterbenden Mäuse ab.

Vergleichen wir die Werte der LD_{50} von S, das bei verschiedener Temperatur gelagert war (Tabelle), so beobachten wir, daß das Verhältnis der letalen Aktivitäten zueinander innerhalb eines halben Jahres nahezu unverändert geblieben ist (S_{II} gelagert bei −10 °C gleich 1 gesetzt).

Tabelle 1. Verhältnis der LD_{50} von S_{II} −10 °C, +2 °C und +20 °C

nach Monaten	−10 °C		+2 °C		+20 °C
2,5	1	:	4,6	:	11,3
3,5	1	:	3,2	:	8,8
4,5	1	:	5,5	:	12,0
6,5	1	:	3,5	:	13,4

Wir können feststellen, daß eine Abnahme der letalen Aktivität von S durch Lagerung bei Kühlschrank- bzw. Zimmertemperatur sowie durch Alterung weitgehend vermieden werden kann, wenn das Toxin bei −10 °C aufbewahrt wird.

1.3 Vergleich der letalen Wirkung verschiedener Staphylolysine

Wir haben in den Versuchen vom 1. 7. 1959 S_I und S_{II} verglichen. Dabei war S_I stärker letal wirksam als S_{II}. Der Unterschied, auf der Abb. 51 dargestellt, ist mit

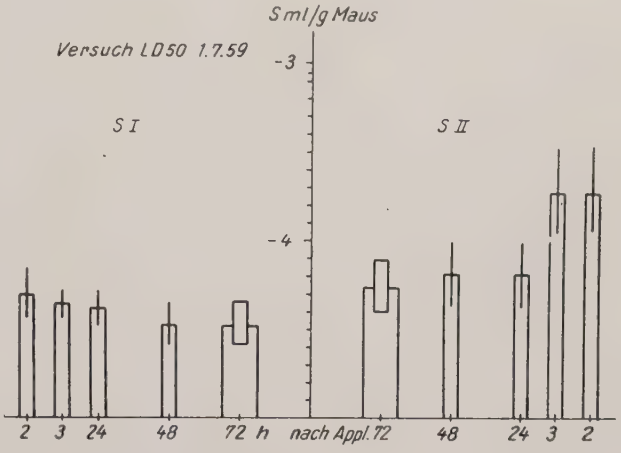


Abb. 51. Vergleich der LD_{50} von S_I und S_{II} (Versuch vom 1. 7. 59) (signifikante Differenz 72 h nach Applikation)

Abszisse: Zeit in Stunden nach Toxinapplikation

Ordinate: S in ml/g Maus

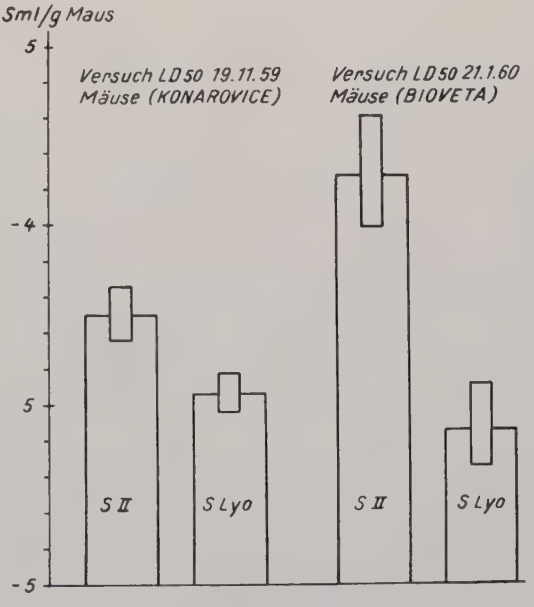


Abb. 52. Vergleich der LD_{50} von S lyo. und S_{II} an Mäusen von der Farm Konarovice bzw. Bioveta (Versuche vom 19. 11. 59 und 21. 1. 60)

(Differenzen hoch signifikant)

einer Fehlergrenze von 2 σ signifikant. Außerdem haben wir mit S_{II} das uns nur in wenigen Proben zur Verfügung stehende S lyo. verglichen. Diese Versuche, am 19. 11. 1959 und am 21. 1. 1960, wurden mit Mäusen verschiedener Herkunft (Konarovice, Bioveta) durchgeführt (Abb. 52). In beiden Versuchen fanden wir S lyo. signifikant stärker letal als S_{II}.

1.4 Einfluß von Alter und Geschlecht der Mäuse auf die letale Wirkung von S

1.41 Suszeptibilität und Alter

Die Frage der Suszeptibilität auf S bei verschiedenem Alter hat JOHANOVSKY (1955) an Ratten studiert. Die Letalität von S nimmt bei jungen Ratten bis zum 18. Lebenstag zu und ändert sich dann nicht mehr. Junge Kaninchen reagieren erst in einem Alter von 4 Monaten auf S (BURKY, 1933).

Wir führten unsere Versuche an jüngeren und älteren Mäusen durch. Während im Durchschnitt die jungen Tiere 11,5–12,5 g (12,2 g) wogen, waren die älteren 17,5–19,0 g (18,4 g) schwer. Die LD_{50} in beiden Tierkollektiven ist als übereinstimmend anzusehen (Abb. 53).

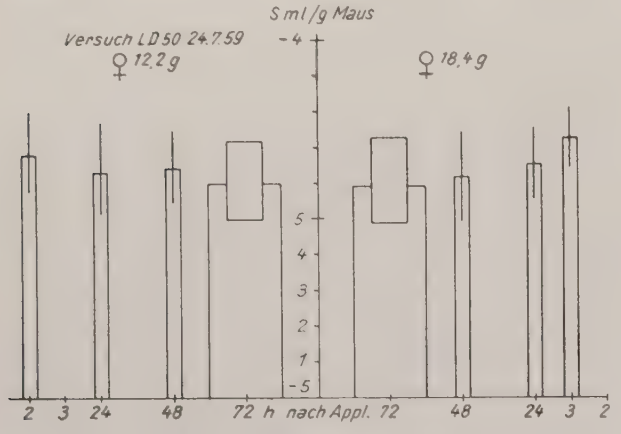


Abb. 53. Letalität und Alter
Koordinaten: siehe Abb. 51 (keine signifikanten Differenzen)

1.42 Geschlechtsspezifische Einflüsse

Soweit wir die Literatur überschauen, sind geschlechtsspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit auf Toxine bisher noch nicht Gegenstand der Untersuchung gewesen. Die Versuche wurden an Mäusen beiderlei Geschlechts aus 2 verschiedenen Farmen durchgeführt. Den ersten Versuch unternahmen wir am 19. 11. 1959 mit Mäusen von KONAROVICE, den folgenden Versuch am 20. 1. 1960 mit Tieren von BIOVETA. In beiden Fällen zeigen die männlichen Mäuse eine niedrigere LD_{50} als die weiblichen Mäuse (Abb. 54). Die Differenz läßt sich bei beiden Kollektiven statistisch sichern.

Die höhere Empfindlichkeit der männlichen Tiere zeigt sich noch in einer weiteren Tatsache. Die Absterbegeschwindigkeit der männlichen Tiere nach S-Intoxikation ist weitaus höher als die von weiblichen (Abb. 55). Bei vergleichbaren Bedingungen (Dosierung, Gewicht der Tiere usw.) sterben 50 % der männlichen Versuchstiere nach Toxinapplikation innerhalb von 3 Stunden. Bei den weiblichen Mäusen kommen 50 % der Tiere erst nach 3 Tagen ad exitum. Die Absterbegeschwindigkeit bei den Männchen ist in den ersten Stunden sehr hoch, während diese bei den weiblichen Tieren erst im Laufe von 24 Stunden ein Maximum erreicht. Ein ähnliches Bild sahen wir im Versuch am 20. 1. 1960 mit Mäusen aus der anderen Zucht. Unter vergleichbaren Verhältnissen waren hier 50 % der männlichen Tiere am 2. Tag, die weiblichen erst am 7. Tag gestorben.

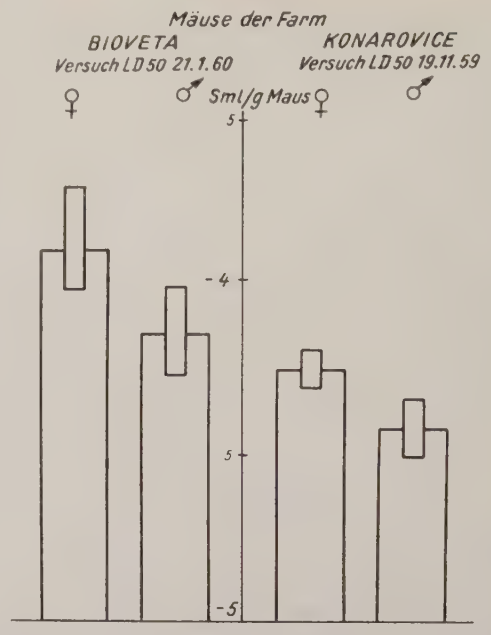


Abb. 54. Letalität und Geschlecht an Mäusen von der Farm Bioveta bzw. Konarovice (Versuche vom 19. 11. 59 und 21. 1. 60)
(Differenzen signifikant)

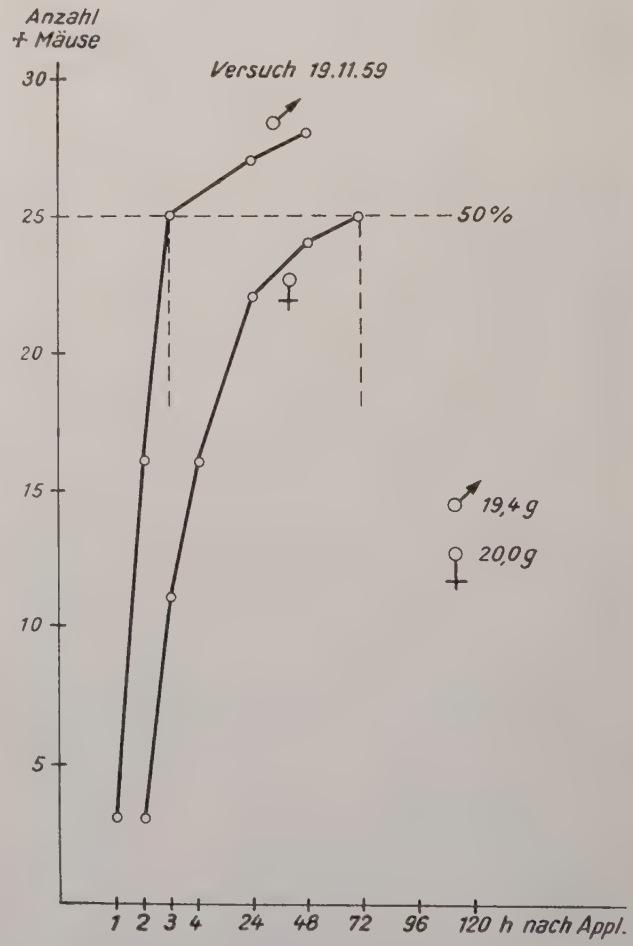


Abb. 55. Absterbegeschwindigkeit und Geschlecht entsprechend Abb. 54
Abszisse: Stunden nach Applikation
Ordinate: Anzahl der gestorbenen Mäuse
Versuchsansatz je 50 Mäuse

1.5 Die letale Wirkung von S und die Suszeptibilität verschiedener Tierarten

Über die Empfindlichkeit verschiedener Spezies auf S wissen wir nur wenig. Besonders heftig reagiert das Kaninchen auf Staphylokokkentoxin. Die Verwendung von Kaninchen für den Hauttest ist gut bekannt. Ein Staphylokokkentoxin, das ein Kaninchen von 2000 g mit einer Dosis von 10^{-1} ml bei i.v. Gabe tötet, kann eine Maus von 20 g in einer Dosierung von etwa $2 \cdot 10^{-2}$ ml ad exitum bringen, ein 300 g schweres Meerschweinchen dagegen bleibt bei der für Kaninchenletalen Dosis (D'ANTONA) am Leben. Die Empfindlichkeit nimmt also ab in der Reihenfolge: Kaninchen, Maus, Meerschweinchen.

Die vergleichende Prüfung für die letale Wirkung von S führten wir an Mäusen (18 ± 1 g), Ratten (190 ± 10 g) und Meerschweinchen (260 ± 10 g) ausschließlich an weiblichen Tieren durch. Alle Tiere kamen von der BIOVETA-Farm. Die Bestimmung der LD_{50} wurde in der üblichen Form vorgenommen. Insgesamt kamen 50 Mäuse, 15 Ratten und 15 Meerschweinchen in den Versuch. Während bei Ratten und Mäusen i.v. appliziert wurde, applizierten wir das Toxin dem Meerschweinchen direkt ins Herz.

Der intracardialen Anwendung am Meerschweinchen wurde nicht nur aus anatomischen Gründen der Vorzug gegeben, sondern auch in Kenntnis der Tatsache, daß am Meerschweinchenherzen auch nach relativ hohen Dosen S keine toxischen Erscheinungen aufgetreten waren. Die Dosis, die am isolierten Herzvorhofpräparat angewandt wurde, war größer als die Dosis, die wir für die letale Wirkung von S am Meerschweinchen benutzten. Die Befunde am Meerschweinchen bleiben nur bedingt vergleichbar.

Ergebnisse

Der Bestimmung der LD_{50} wurden die %-Werte der Sterblichkeit des 3. Tages nach S-Applikation zugrunde gelegt. Die graphische Auswertung auf logarithmischem Wahrscheinlichkeitspapier ergaben bei:

		Mäusen	Ratten	Meerschweinchen
für die	LD_{50}	$2{,}05 \cdot 10^{-3}$	$1{,}28 \cdot 10^{-2}$	$3{,}4 \cdot 10^{-3}$
	LD_{84}	$2{,}4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}94 \cdot 10^{-2}$	$4{,}0 \cdot 10^{-3}$
	LD_{16}	$1{,}75 \cdot 10^{-3}$	$0{,}85 \cdot 10^{-2}$	$2{,}55 \cdot 10^{-3}$

Die Gesamtzahl der Tiere, die zwischen den Dosen LD_{16}–LD_{84} benutzt wurden

N′	10	6	6

Die Steigung der Dosen/Sterblichkeitskurve mit Sicherungsgrenzen errechnet sich mit S

S_1 1,17(1,01–1,36) S_2 1,5(1,11–2,03) S_3 1,25(1,0–1,82).

Für die gegebenen Werte S und N′ bestimmen wir den Faktor

$f_{LD_{50}}$	1,15	1,6	1,29

Die Errechnung der Sicherungsgrenze für jede LD_{50} ergibt sich durch Multiplikation und Division mit $f_{LD_{50}}$ und Umrechnung auf ml/g. Die LD_{50} ml/g beträgt

für Mäuse	$1{,}14(0{,}995–1{,}305) \cdot 10^{-4}$
für Ratten	$6{,}74(4{,}22 –10{,}8) \cdot 10^{-5}$
für Meerschweinchen	$1{,}31(1{,}02 –1{,}66) \cdot 10^{-5}$

Die Prüfung auf Parallelität der Geraden

Das Verhältnis der Neigung $S_1 : S_2 : S_3$

$$\text{P.S.} \quad \frac{S_2}{S_1} = 1{,}28 \qquad \frac{S_2}{S_3} = 1{,}2 \qquad \frac{S_3}{S_1} = 1{,}07 .$$

Der Faktor von P.S. laut Tabelle

$f_{P.S.}$	1,4	1,61	1,49

Da $f_{P.S.}$ > als P.S., ist Parallelität vorhanden.

Die Berechnung der relativen Toxizität mit Sicherungsgrenzen

Die Division der ermittelten LD_{50} ergibt

$$\text{M} \quad \frac{LD_{50}\ \text{Maus}}{LD_{50}\ \text{Ratte}} = 1{,}69 \quad \frac{LD_{50}\ \text{Ratte}}{LD_{50}\ \text{Meerschweinchen}} = 5{,}16$$

$$\frac{LD_{50}\ \text{Maus}}{LD_{50}\ \text{Meerschweinchen}} = 8{,}74 .$$

Der Faktor von M laut Tabelle

f_M	1,63	1,7	1,34

Nach Multiplikation von M und der Sicherungsgrenzen mit 100 ist das Endresultat:

169(104–275) 516(308–880) 874(652–1170)

Die LD_{50} der Maus beträgt also gegenüber der LD_{50} der Ratte 169 % mit den Grenzen von 104–275 %. Die Differenz in der Toxizität ist für alle Ergebnisse statistisch signifikant.

Zusammenfassung der Befunde IV.1

a) Das Vergiftungsbild nach S-Intoxikation äußert sich in unkoordinierten Laufbewegungen, Einschränkung der Funktion der Hinterpfoten, Seitenlage, Streckkrämpfen der Extremitäten, Schnappatmung und Exitus.

b) Für die vergleichende Bestimmung der LD_{50} eignet sich die Mortalität des 3. Versuchstages.

c) Die Verminderung der letalen Aktivität von Filtraten durch Aufbewahren bei Kühlschrank- bzw. Zimmertemperatur oder durch Alterung kann beträchtlich herabgesetzt werden, wenn das Filtrat bei −10 °C gelagert wird.

d) Die letale Wirksamkeit von S aus Wood 46 differiert von Charge zu Charge.

e) Männliche Mäuse reagieren in bezug auf letale S-Wirkung signifikant stärker als weibliche Mäuse.

f) Die Empfindlichkeit auf die letale Wirksamkeit von S nimmt ab in der Reihenfolge Ratte, Maus.

g) Das Meerschweinchen ist entgegen der Feststellung von D'ANTONA ebenfalls empfindlich auf S.

2. Die hämolytische Wirkung von Staphylolysin

Einleitung und Methodik

Eine der hervorstechendsten Eigenschaften des Staphylokokkentoxins ist die Fähigkeit, rote Blutkörperchen zu lösen. Diese Tatsache war schon vor über einem halben Jahrhundert bekannt und ist seitdem immer wieder bis in die jüngste Zeit Anlaß für Forschungen gewesen. Obgleich eine große Anzahl von Arbeiten über die Staphylokokkentoxin-Hämolyse vorliegen, sind viele Fragen noch ungeklärt geblieben. Nach

den heutigen Erkenntnissen werden mehrere Hämolysine (Toxine) des Staphylokokkentoxins biologisch unterschieden: α-Hämolysin (Literatur siehe bei SCHMIDT, 1940, VAN HEYNINGEN, 1950 und D'ANTONA, 1958), β-Hämolysin (GLENNY und STEVENS, 1935), γ-Hämolysin (MORGAN und GRAYDON, 1936), δ-Hämolysin (WILLIAMS und HARPER, 1947) und ε-Hämolysin (ELEK und LEVY, 1950). Während den 3 letzten Hämolysinen nur ein bedingtes Interesse entgegengebracht wird, unterscheidet man in der Hauptsache das α-Lysin, das durch menschenpathogene Stämme produziert wird, vom β-Lysin, das von tierpathogenen Stämmen gebildet wird (D'ANTONA). Die Hämolyse des α-Lysins in vitro soll an Empfindlichkeit in der Reihenfolge abnehmen: Kaninchen, Rind, Hammel, Ziege, Mensch, Pferd, Meerschweinchen (GROSS, 1932), die des β-Lysins: Hammel und Rind, während die Erythrozyten von Mensch, Kaninchen und Meerschweinchen nur schwach lysiert werden (BRYCE und ROUNTRÉE, 1936; LLEWELLYN-SMITH und PRICE, 1938). Das γ-Lysin löst Zellen vom Pferd, Ratte, Rind, Meerschweinchen, Hammel, Mensch, Kaninchen (LLEWELLYN-SMITH und PRICE, 1938 b), während δ-Lysin nur Hammelzellen hämolysiert. Die unterschiedliche Suszeptibilität der Erythrozyten der einzelnen Tierarten ist in bezug auf die Hämolysine aber nur bedingt vergleichbar, da diese mit sehr differenten in-vitro-Methoden bestimmt wurden. Die hämolytische Aktivität der Lysine wurde teils mit der Blutplattenmethode auf Nährboden, teils im Reagenzglas mit Nährbouillon bzw. physiologischer Salzlösung bestimmt. Wir führen nur die Befunde der Hämolyse mit Staphylokokkentoxin an, die vornehmlich mit Zellen in physiologischer Lösung erhalten wurden. Dabei darf natürlich nicht übersehen werden, daß auf Grund der sehr heterogenen Methodik, die die einzelnen Untersucher anwenden, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eine Einschränkung erfährt. Bis in die jüngste Zeit wurde z. B. die subjektive Methodik zur Bestimmung des Hämolysegrades herangezogen (BUTLER, 1959). Überschaut man unter diesen Prämissen die Befunde, die ausschließlich an Kaninchenzellen und vornehmlich mit Filtraten von menschenpathogenem Staphylokokkentoxin erhalten wurden, so finden wir folgendes Bild:

Nach SCHUR (1903) wird aus gleichen Blutmengen um so mehr „Farbstoff gelöst", je größer die zugesetzte Menge Toxin ist. Das entspricht den Befunden von FORSSMANN (1933), der mit steigender Lysinkonzentration eine „ungefähr proportionale" Zunahme der Hämolyse findet. Damit ist mit RUD (1955) gesagt, daß der Grad der Hämolyse eine Funktion der Lysinkonzentration ist.

Nach MANGALO und RAYNAUD (1959) vermindert sich der prozentuale Anteil nicht lysierter Erythrozyten bei einer gegebenen Toxinkonzentration mit zunehmender Hämolysedauer. Damit ist also der Grad der Hämolyse eine Funktion der Einwirkungszeit des Lysins.

Die Temperatur zwischen 0 und 37 °C ist nach FORSSMANN ohne Einfluß auf die S-Hämolyse. Dieser Befund ist nur unter Vernachlässigung zeitlicher Faktoren verständlich, denn RUD findet mit steigender Temperatur eine Zunahme der Hämolysegeschwindigkeit. Günstige Temperaturbedingungen für die S-Hämolyse gibt RUD für 20 bis 25 °C an. MANGALO und RAYNAUD sehen optimale Hämolysebedingungen — unter optimal wird die kürzeste Hämolysezeit verstanden — zwischen 34 bis 36 °C. Damit ist also die „Hämolyse eine Funktion der Temperatur" (RUD, MANGALO und RAYNAUD) und die Hämolysegeschwindigkeit temperaturabhängig.

Der Einfluß der Zellkonzentration auf die S-Hämolyse ist nach MANGALO und RAYNAUD nicht vorhanden, soweit eine Veränderung der Zellzahl im Bereich einer Zehnerpotenz liegt. Die von SCHUR und FORSSMANN diesbezüglich gemachten Angaben sind wegen der angewandten unzulänglichen Methodik nicht verwertbar.

Die Wasserstoffionenkonzentration zur Durchführung der S-Hämolyse wird übereinstimmend von FORSSMANN, RUD und D'ANTONA zwischen p_H 6,5 bis 8,5 angegeben. Ein p_H-Optimum finden dagegen MANGALO und RAYNAUD bei p_H 5,2. Diese Autoren weisen an Hand einer Kurve darauf hin, daß die Hämolysegeschwindigkeit zwischen p_H 4,4 bis 5,0 stark zunimmt, bei p_H 5,2 ein Maximum erreicht und ab p_H 5,7 wieder abnimmt. Zwischen p_H 6,3 und 7,4 bleibt die Hämolysegeschwindigkeit dann konstant.

Die Beeinflussung der S-Hämolyse durch Serum ist wegen des hohen Gehaltes an Antilysinen eine seit langem bekannte Tatsache. Ohne Wirkung auf die S-Hämolyse war die Zugabe von Cholesterin und Lecithin (FORSSMANN). Zu erwähnen ist, daß MERCIER (1938) die S-Hämolyse mit Ascorbinsäure spezifisch und reversibel hemmen konnte, ohne die letale und dermonekrotische Aktivität des Toxins zu beeinflussen. Er zeigte in seinen Versuchen den fehlenden Einfluß von Ascorbinsäure auf die Hämolysen mit Saponin, Äther und Lysolecithin. Weiter ist bekannt, daß in hypertonem Milieu (5% NaCl-Lösung) die S-Hämolyse ausbleibt (RIGDON, 1933).

Berühren wir noch den Einfluß anderer Faktoren auf das Toxin. Hämolysin aus Bouillonkulturfiltrat ist thermolabil, während auf Agarkultur gewachsenes relativ thermostabil ist (SCHMIDT). Die Thermoresistenz des α-Lysins ist geringer als die des β-Lysins. RUD sah eine bedeutende Abnahme der hämolytischen Aktivität, wenn er das α-Lysin 60 min bei 56 °C erhitzte. In diesem Zusammenhang soll die „Hot-cold-Lysis" Erwähnung finden, die besonders bei der Hämolyse mit β-Lysin angewandt wird. Man versteht darunter die Einwirkung des Lysins auf die Zellen eine Stunde lang bei 37 °C (Adsorption) und anschließend etwa 20 h bei 2 bis 4 °C. Dieses Vorgehen ist umstritten und wird von FORSSMANN, LEVINE (1937) u. a. abgelehnt, andererseits aber nach wie vor angewandt (D'ANTONA). Nach v. HEYNINGEN findet nur bei Zimmertemperatur keine Hämolyse des β-Toxins bei Hammelzellen statt.

Der Mechanismus der Hämolyse ist nicht klar. Eine Adsorption der Hämolysine an die Erythrozyten entsprechend einer Immunhämolyse wird für wahrscheinlich gehalten. Andere Autoren messen der Adsorption nur relative Bedeutung zu. Wieder andere sehen in der S-Hämolyse einen enzymatischen Vorgang, dem eine Adsorption vorausgeht entsprechend dem Lipoidgehalt der Zellen der verschiedenen Spezies.

(Forssmann, 1933, 1934, 1939; Seifert, 1935; Levine, 1938, 1939; Schur, 1903; Rud, 1955). Bei der Hämolyse kommt es nicht zu einer Zerstörung der Zellstruktur (Gengou, 1932).

Unsere Aufgabenstellung, die hämolytische Aktivität des von uns untersuchten Staphylolysins zu untersuchen, ergibt sich aus dem oben Angeführten. Unter Berücksichtigung der Faktoren, die auf die S-Hämolyse einwirken, führten wir vergleichende Untersuchungen mit Blutzellen verschiedener Tierarten durch und waren bestrebt, quantitative Beziehungen zu finden. Erythrozyten von Katzen wurden ebenfalls untersucht, da über deren Verhalten gegenüber S uns nichts bekannt war. Außerdem wurden einige Untersuchungen über die Wirkungsweise von S durchgeführt und einige Staphylolysine in ihrer hämolytischen Aktivität miteinander verglichen.

Methodik

Für die Hämolyseversuche wandten wir eine ähnliche Technik an wie bei unseren früheren Mitteilungen mit Hexadecylsulfonat (Jung, Wendler, Wiegershausen, 1956; Wiegershausen, 1956). Die Versuche wurden mit Erythrozyten von Kaninchen, Katzen, Ratten, Hammeln und Rindern durchgeführt. Diese gewannen wir auf folgende Weise: das Blut wurde den Spendertieren durch Herz- oder Venenpunktion entnommen, durch Rühren mit einem Holzstab defibriniert, sodann durch ein Mullsieb gegossen und in der Zentrifuge (15 min, 1400 g) serumfrei gewaschen. In derselben physiologischen Salzlösung, die $^1/_{10}$ Phosphatpuffer nach Muralt (p_H 7,2 bis 7,3) enthielt, wurden die Zellen anschließend suspendiert. Die Zellzählungen nahmen wir mit Hilfe der Bürkerschen Zählkammer vor und stellten danach die Blutzellsuspensionen auf eine bestimmte Zellzahl ein. Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität von S wurde in der Hauptsache S_{II} angewandt (5 bis 7,5 Monate alt, DHM α 1280, DHM β 160, LH α 150). Vergleichende Versuche wurden mit S lyo. durchgeführt. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, die in ihrem Konzentrationsbereich alle Stadien der Hämolyse erfaßte (10^{-3} ml S/ml bis $2{,}44 \cdot 10^{-7}$ ml S/ml), wie wir durch Vorversuche ermittelt hatten. Jede Konzentration dieser logarithmischen Verdünnungsreihe erhielt eine Zellaufschwemmung von konstanter Menge ($5 \cdot 10^7$ Zellen/ml Ansatz) mit Hilfe einer federgetriebenen Spritze. Eine schnelle Mischung der Zellen in der S-Verdünnung immer in der gleichen Weise war für die Reproduzierbarkeit unserer Versuche äußerst wichtig. Neben der S-Verdünnungsreihe waren entsprechend Zellen nur im Versuchsmedium ohne S und in Aq. dest. angesetzt. Alle Manipulationen für den Versuchsansatz wurden mit geeichten Geräten, zumindest aber immer mit den gleichen Geräten vorgenommen. Die Angaben der S-Konzentration sind im Endansatz ml S/ml.

Die hämolytische Wirkung von S wurde nun in bestimmten Zeitabständen verfolgt und gemessen. Dabei wurde jeweils nach Zentrifugierung (5 min, 1400 g) der Hämoglobingehalt des Überstehenden kolorimetrisch im Spektralphotometer (Typ Rumburk, ČSSR) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 520\ m\mu$ bestimmt. Nach Subtraktion des Photometerwertes der nur geringen Spontanhämolyse bei den in Kochsalz suspendierten Zellen erhielten wir Kurven, bei denen in Abhängigkeit von Zeit und S-Konzentration der Hämolysegrad in Prozenten angegeben werden konnte.

Die Hämolysekurven sind als Summenkurven von Verteilungen des jeweils untersuchten Zellkollektivs anzusehen. Auf die Bedeutung statistischer Faktoren sei damit beim Hämolyseprozeß hingewiesen (Jung, 1949, 1952, 1959). Für die Auswertung der Hämolysekurven wurde graphisch durch Interpolation diejenige S-Konzentration, HC 50 %, ermittelt, die nach einer bestimmten Zeit gerade 50 % Hämoglobin in Freiheit setzt. In gleicher Weise konnte aus den Hämolysezeitkurven diejenige Zeit, HT 50 %, ermittelt werden, die notwendig ist, um bei einer definierten S-Konzentration gerade 50 % der Zellen zu lösen. Unser Vorgehen bei der Auswertung ergibt sich aus der Abbildung 56 (I bis III). Die so ermittelten Größen werden in einem doppelt logarithmischen Netz gegeneinander aufgetragen und ergeben eine Kurve der beiden Parameter Konzentration und Zeit.

Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

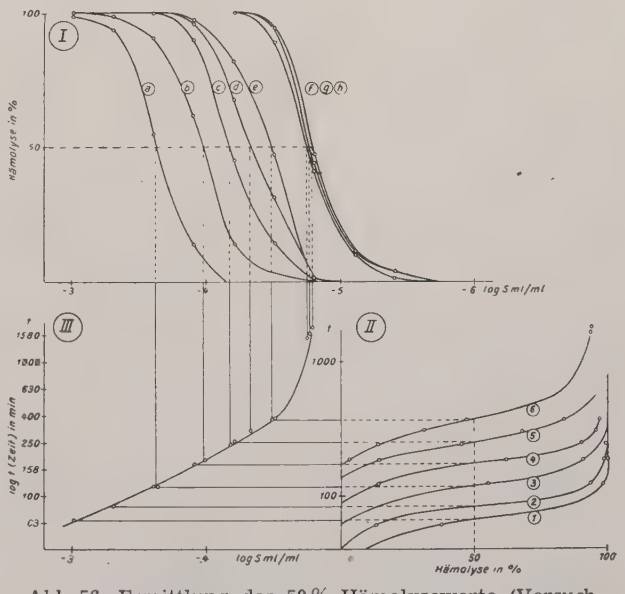


Abb. 56. Ermittlung der 50 % Hämolysewerte (Versuch 26. 11. 1959, Katze)

I. Ermittlung des HC 50 %

Abszisse: log S-Konzentration; Ordinate: Hämolysegrad in %

	a	b	c	d	e	f	g	h	
nach	120	180	240	300	360	1450	1600	1785	min

II. Ermittlung des HT 50 % (Abb. um 90° gedreht)

Abszisse: log *t*-Zeit in min; Ordinate: Hämolysegrad in % bei S-Konzentration

1	2	3	4	5	6	
10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	$1{,}25 \cdot 10^{-4}$	$6{,}25 \cdot 10^{-5}$	$3{,}13 \cdot 10^{-5}$	ml/ml

III. Zusammenstellung der 50 %-Werte

Ordinate: log *t* in min; Abszisse: log S ml/ml

Ergebnisse

2.1 Die Abhängigkeit der S-Hämolyse von der Zeit und Lysinkonzentration

Der Verlauf der Hämolysekurven, wie auf der Abb. 56 für Katzenerythrozyten dargestellt, ist der gleiche, wie

wir ihn bei der S-Hämolyse mit Kaninchen-, Ratten-, Hammel- und Rinderzellen finden. Nach Zugabe der Zellen zeigt sich nach einer verschieden langen Latenz entsprechend der Empfindlichkeit der Zellen der einzelnen Tierarten der Hämolysebeginn. Der Hämolysegrad (Abb. 56, I) nimmt mit steigender S-Konzentration zu. Die Hämolysekurven der einzelnen Zeitintervalle (*a* bis *h*) verschieben sich in Richtung der niederen S-Konzentrationen und haben zueinander einen ähnlichen Verlauf. Je größer also die S-Konzentration, um so höher der Hämolysegrad. Entsprechend findet sich bei den einzelnen Lysinkonzentrationen mit zunehmender Hämolysedauer eine Erhöhung des Hämolysegrades (Abb. 56, II). Die Hämolysezeitkurven und die Hämolysekonzentrationskurven haben einen S-förmigen Verlauf, jedoch ist die Steigung der Hämolysezeitkurven stärker. Die aus den HC 50 %- und HT 50 %-Werten dargestellte Kurve eines Versuchs mit Katzenzellen (Abb. 56, III) steigt im Bereich von 10^{-3} bis $4 \cdot 10^{-5}$ stetig an. Von einer bestimmten minimalen Lysinkonzentration (Grenzkonzentration) ab wird die Hämolyse schwächer, d. h. unterhalb dieser ausgezeichneten S-Konzentration wird ein HC 50 % nicht mehr erreicht. Der in der Abbildung dargestellte Befund ergibt sich auch bei Zellen anderer Tierarten.

2.2 Vergleich Zeit/Konzentrationskurven bei Erythrozyten verschiedener Spezies

Die Hämolysezeit für die mittlere Hämolyse nimmt mit fallender Lysinkonzentration zu; umgekehrt verhält es sich mit der Hämolysegeschwindigkeit, die mit fallender S-Konzentration geringer wird.

In der Abb. 57 sind die HC 50 % und HT 50 % als Mittelwerte aus mehreren Versuchen zusammengestellt.

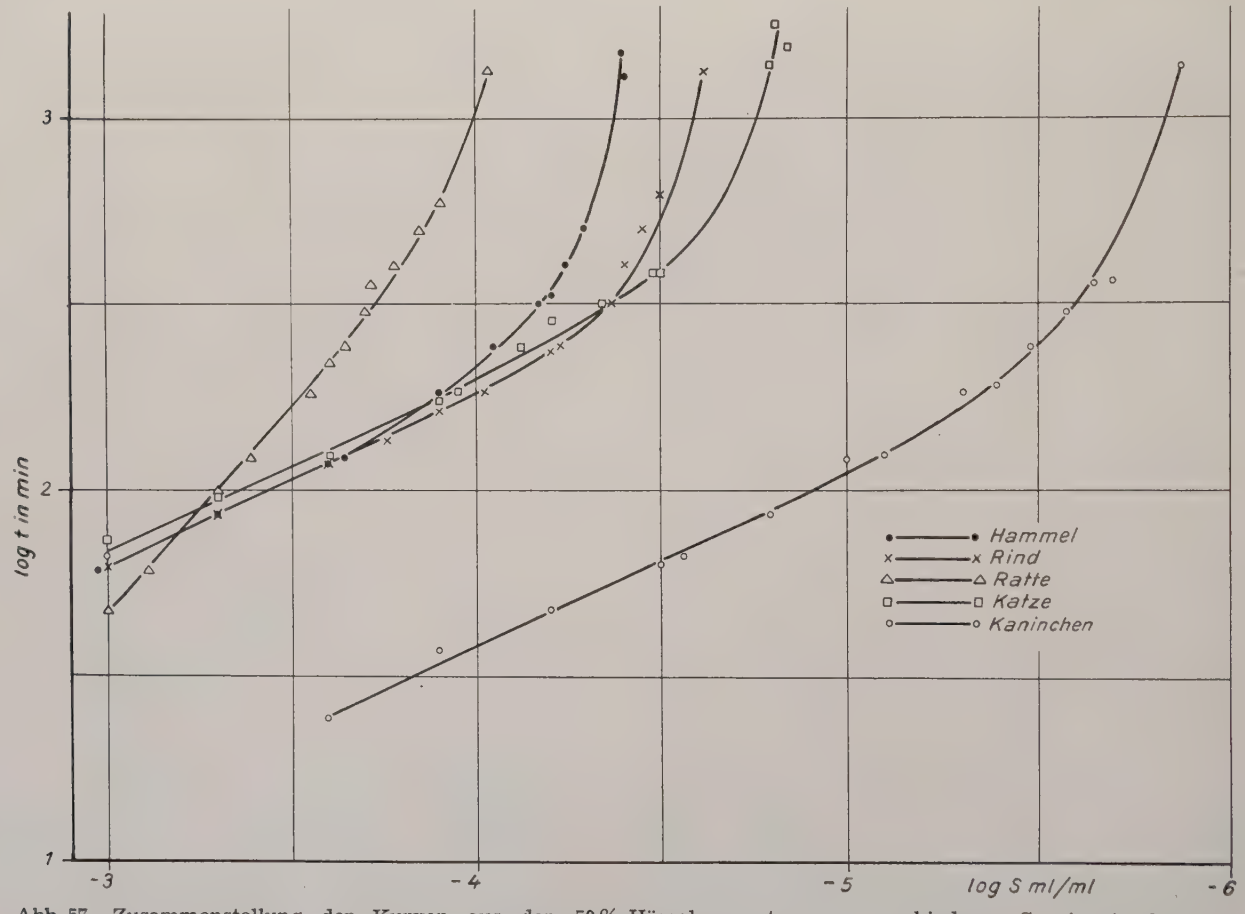


Abb. 57. Zusammenstellung der Kurven aus den 50 %-Hämolysewerten von verschiedenen Spezies (nach Mittelwerten aus mehreren Versuchen)

Abszisse: log S ml/ml; Ordinate: log *t* min

Die Mittelwerte wurden aus folgenden Versuchen errechnet:

Zellen von	Kaninchen	Katze	Rind	Hammel	Ratte
	13. 11.	18. 11.	8. 1. A	4. 12.	30. 11.
	16. 11.	24. 11.	5. 1. B	8. 12. A	3. 12.
	17. 11.	25. 11.	15. 1.	8. 12. B	7. 12.
	23. 11.	26. 11.		11. 12. A	14. 12. A
	5. 1.	7. 1.		11. 12. B	14. 12. B
	12. 1. A			15. 12.	6. 1.
	12. 1. B				13. 1.
	15. 2.				
	17. 2.				

Blut von Tieren der gleichen Spezies zeigt häufig übereinstimmende 50%-Hämolysewerte, die errechneten Mittelwerte weisen daher nur geringe Streuungen auf.

Der Verlauf der Zeit/Konzentrationskurven ist für die Zellen der einzelnen Tierarten, abgesehen von den unterschiedlichen Konzentrationsbereichen, recht ähnlich. In einem sehr ausgedehnten Konzentrationsbereich (10^{-3} bis 10^{-6} ml S) hämolysieren die Zellen von Kaninchen. Eine Zehnerpotenz höher liegen die Konzentrationsbereiche, in denen die Zellen von Katze, Rind, Hammel (etwa 10^{-3} bis 10^{-5}) gelöst werden. In einem sehr schmalen Konzentrationsbereich (10^{-3} bis 10^{-4} ml) hämolysieren die Zellen der Ratte.

Die Hämolysezeit bei entsprechender Lysinverdünnung stellt die Hämolysegeschwindigkeit dar. Diese ist augenscheinlich nicht nur abhängig von der S-Konzentration, sondern vor allem von der Zellart. Kaninchenzellen hämolysieren weitaus schneller als die Zellen der anderen Spezies. Die Hämolysegeschwindigkeit in ihrer Abhängigkeit von der jeweiligen S-Konzentration ergibt für die Zellen aller Tierarten eine lineare Abhängigkeit bis zu einer bestimmten S-Verdünnung.

Vergleichen wir an Hand der Abbildungen (57) für die Zellen einzelner Spezies nach 1000 min die HC 50%, so ergibt sich, wenn wir den entsprechenden Wert für die Kaninchenzellen gleich 1 setzen, folgende Beziehung:

Tabelle 2. Verhältnis der HC 50%

Kaninchen	1
Katze	12
Rind	18
Hammel	29
Ratte	70

Das Verhältnis der HC 50% deutet auf die Empfindlichkeit der Zellen der einzelnen Spezies. Rattenzellen zeigen die größte S-Resistenz, dagegen haben, wie bekannt, Kaninchenzellen die höchste Empfindlichkeit für S. Die Zellen der Katze zeigen eine Empfindlichkeit, die größer ist als die von Rinder- und Hammelzellen, insbesondere, wenn man auch ihre Grenzkonzentrationen (Abb. 57) berücksichtigt. Die starke Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Konzentration zeigt sich in der Tatsache, daß bei Abnahme der Lysinkonzentration um den Faktor 10 die Hämolysezeit um den Faktor 3 bei Kaninchen-, Katzen-, Rinder- und Hammelzellen zunimmt, bei Rattenzellen wird die Hämolysezeit dagegen über 10mal länger.

2.3 Der Einfluß der Zellzahl auf die S-Hämolyse

Einige Versuche wurden mit Zellen verschiedener Spezies durchgeführt, die den Einfluß der Zellkonzentration demonstrieren sollen. Die Hämolysereihen wurden wie üblich angesetzt, dabei Zellkonzentrationen von $5 \cdot 10^7$, $2{,}5 \cdot 10^7$, $1{,}25 \cdot 10^7$ und $6{,}25 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwandt.

Betrachtet man (Abb. 58) die Kurven aus den 50%-Hämolysewerten, so findet sich für alle Zellkonzentrationen ein Kurvenverlauf mit gleicher Steigung. Die Steigung ist schwächer bei den Hammel- und Kaninchenzellen. In einem bestimmten Lysinbereich findet sich eine Abhängigkeit von der Zellzahl für Kaninchen- und Rattenzellen, in gleicher Weise übrigens auch für Katzenzellen, derart, daß mit Verminderung der Zellzahl für einen vergleichbaren Hämolysegrad die S-Konzentration und Hämolysezeit abnehmen. Diese Abhängigkeit zeigt sich bei Hammel- und Rinderzellen (wegen des Übereinanderfallens der Kurven wurden letztere nicht gezeichnet) in dem von uns untersuchten Konzentrationsbereich nicht.

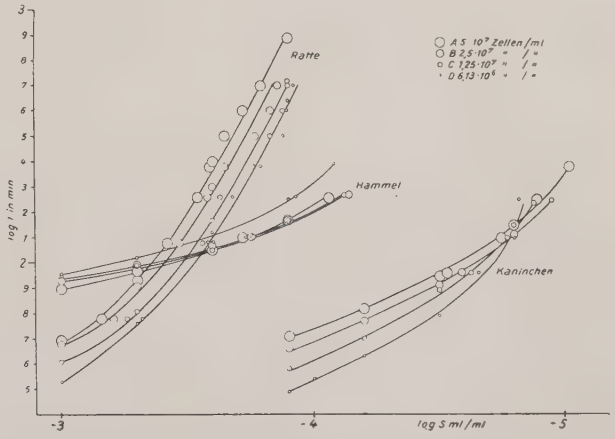


Abb. 58. Hämolysegeschwindigkeit und Zellkonzentration
Abszisse: log S; Ordinate: log t
Kurve der 50%-Hämolysewerte bei den Zellkonzentrationen *A*, *B*, *C*, *D* von Ratte, Hammel und Kaninchen

Vergleichen wir darüber hinaus an Hand der Versuchsprotokolle bei entsprechender S-Konzentration den Hämolysegrad in bezug auf die Zellkonzentration, so sehen wir bei Kaninchen-, Ratten- und Katzenzellen bei niederen Zellkonzentrationen einen höheren Hämolysegrad als bei höheren Zellkonzentrationen. Diese Beziehung ist bei Rinder- und Hammelzellen nicht vorhanden.

Diese Befunde veranlaßten uns, den Einfluß verschiedener Erythrozytenstromata auf die S-Hämolyse zu untersuchen.

2.4 Der Einfluß von Erythrozytenstromata auf die S-Hämolyse

Verschiedene Lysinkonzentrationen inkubierten wir mit Stromata von Kaninchen- und Hammelblut für mehrere Stunden. Die Stromata waren durch Aq.-dest.-Hämolyse gewonnen und so lange in der Zentrifuge gewaschen bis sie farbstofffrei waren. Das Waschen wurde zunächst in Aq. dest. und dann in der gepufferten Salzlösung durchgeführt. Die Konzentration an Stromata betrug bei den einzelnen S-Konzentrationen mindestens das 10fache der Erythrozytenmenge, die wir später zusetzten. Nach Zugabe der Erythrozyten ($5 \cdot 10^7$ Zellen/ml) zu den Lysinverdünnungen verglichen wir in bestimmten Zeitabständen den Fortgang der Hämolyse photometrisch bei den mit Stromata inkubierten S-Konzentrationen und ihren Kontrollen, die ohne Stromata angesetzt waren. Wir kombinierten

1. Erythrozyten von Kaninchen mit Stromata von Kaninchen.
2. Erythrozyten vom Hammel mit Stromata vom Hammel.
3. Erythrozyten von Kaninchen mit Stromata vom Hammel.

Die Ergebnisse finden sich für unsere Versuche vom 15. 12. 1959 und 7. 12. 1959 in der Tabelle zusammengestellt. Alle Konzentrationen sind je ml Endansatz angegeben (Tabelle).

Tabelle 3

S ml/ml	Stroma	Erythrozyten	nach min	Photometerwert	Hämolysegrad in %
Versuch 15.12.					
P 10^{-3}	$5 \cdot 10^8$ K	$5 \cdot 10^7$ K	30	80	98
Ko 10^{-3}	—	$5 \cdot 10^7$ K	30	80	98
Versuch 7.12.					
P $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ H	45	1	2
Ko $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	—	$5 \cdot 10^7$ H	45	3	5
P $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ H	75	30	51
Ko $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	—	$5 \cdot 10^7$ H	75	30	51
P $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ H	135	54	92
Ko $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	—	$5 \cdot 10^7$ H	135	54	92
P $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ H	180	57	97
Ko $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	—	$5 \cdot 10^7$ H	180	57	97
P $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ H	235	58	98
Ko $6{,}7 \cdot 10^{-4}$	—	$5 \cdot 10^7$ H	235	58	98
Versuch 7.12.					
P $4 \cdot 10^{-5}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ K	45	33	47
Ko $4 \cdot 10^{-5}$	—	$5 \cdot 10^7$ K	45	37	53
P $4 \cdot 10^{-5}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ K	75	66	94
Ko $4 \cdot 10^{-5}$	—	$5 \cdot 10^7$ K	75	64	92
P $4 \cdot 10^{-5}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ K	135	70	100
Ko $4 \cdot 10^{-5}$	—	$5 \cdot 10^7$ K	135	70	100
P $4 \cdot 10^{-5}$	$6{,}7 \cdot 10^8$ H	$5 \cdot 10^7$ K	180	70	100
Ko $4 \cdot 10^{-5}$	—	$5 \cdot 10^7$ K	180	70	100

P = Probe
Ko = Kontrolle
K = Stromata bzw. Erythrozyten vom Kaninchen
H = Stromata bzw. Erythrozyten vom Hammel

Als Ergebnis finden wir:

1. Die Photometerwerte und entsprechend die Hämolysewerte der Proben und Kontrollen zeigen keine Differenzen. Der Ablauf der Hämolyse in der Zeit stimmt bei Proben und Kontrollen überein.
2. Die S-Hämolyse mit Kaninchenerythrozyten wird durch vorherige Inkubation mit Stromata von Kaninchen und Hammel nicht beeinflußt.
3. Die S-Hämolyse mit Hammelerythrozyten läßt sich ebenfalls nicht durch Stromata beeinflussen.

Wir fanden also zwischen verschieden strukturierten Erythrozytenstromata in bezug auf die S-Hämolyse keine Unterschiede.

Natürlich konnten auch durch die Art der Gewinnung der Stromata die entsprechenden spezifischen Unterschiede, d. h. bestimmte Anteile der Erythrozyten, die mit dem S reagieren könnten, verlorengegangen sein. Es war naheliegend, das ausgetretene Hämoglobin dahinter zu vermuten.

2.5 Der Einfluß von Hämoglobin auf den Ablauf der S-Hämolyse

Wir setzten einer Reihe von Lysinverdünnungen Hämoglobin aus stromafreien, zumindest stromaarmen, Hämolysaten von Kaninchen- und Rinderzellen zu. Die Trennung des Zytoplasmas von den Stromabestandteilen geschah durch hochtouriges Zentrifugieren. Für die Hämolyseversuche benutzten wir nur Kaninchenzellen verschiedener Konzentrationen und wandten außer S_{II} auch S lyo. an. Mit Hämoglobin aus etwa 10^8 Zellen/ml inkubierten wir für 60 min das S-Verdünnungsreihe, während die Kontrollen ohne Hämoglobin belassen wurden. Das Hämoglobin wurde also in einer Menge zugesetzt, die einem Vielfachen des bei der Hämolyse freigesetzten Hämoglobins entsprach. Die angesetzten Lysinkonzentrationen mit und ohne Hämoglobin wurden dann in bestimmten Zeitintervallen photometriert.

Das Ergebnis dieser Versuche ist für einige Hämolysekurven auf der Abb. 59 dargestellt. Die Hämolysekurven wurden gezeichnet: einmal in ihrer Abhängigkeit von der S-Konzentration, zum anderen in ihrer Abhängigkeit von der Zeit. Die Kurven aus der Verdünnungsreihe mit Hämoglobinzusatz (Index „2" am Buchstaben) sind in das Gebiet höherer Lysinkonzentrationen verschoben, außerdem ist die Hämolyse verlangsamt. Die HC 50 % bzw. HT 50 % sind bei der Hämolyse mit Hämoglobinzusatz erhöht gegenüber den Kontrollen. Weiterhin zeigt sich der hemmende Einfluß auf die S-Hämolyse durch das Hämoglobin — wobei es offenbar gleichgültig ist, um welche Art von Hämoglobin es sich handelt (A_2 Rinderhämoglobin, B_2 und C_2 Kaninchenhämoglobin) — in der herabgesetzten Aktivität der Lysinkonzentrationen, d. h. die Hämolyse kommt unter vergleichbaren Bedingungen bei einem niederen Hämolysegrad zum Stillstand und erreicht den 100 %-Wert nicht mehr. Die Depression der hämolytischen Aktivität ist bei höheren S-Konzentrationen stärker als in niederen. Wäre diese Hemmung bei jeder Konzentration gleich, müßten die entsprechenden Kurven parallel verlaufen.

2.6 Der Einfluß von Glukose auf den Ablauf der S-Hämolyse

Aus älteren Arbeiten von Ponder und Mitarbeitern (1926 und 1928) war bekannt, daß Glukose und andere Zucker einen hemmenden Einfluß auf verschiedene hämolytische Systeme haben. Die Hämolyse durch Saponin und Na-taurocholat ließ sich durch Vorbehandlung der Erythrozyten in Zuckerlösung hemmen. Der Angriff des Zuckers war in der Hauptsache auf eine Veränderung der Erythrozyten zurückzuführen, weniger auf eine Veränderung des Hämolysins.

Wir inkubierten eine Reihe von Lysinverdünnungen mit Glukose, 10^{-1} mol. Nach 60 min setzten wir diesen Verdünnungen Zellsuspensionen von Kaninchen, $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml, zu. In den Kontrollgläsern war nur S enthalten. In bestimmten zeitlichen Abständen wurde dann wie üblich photometriert und der Hämolysegrad bestimmt.

Das Ergebnis ist für einen unserer Versuche auf der Abb. 60 dargestellt. Inkubation der Lysinkonzentration mit Glukose führt vorübergehend zu einer Abnahme der hämolytischen Aktivität des Toxins bzw. zu einer

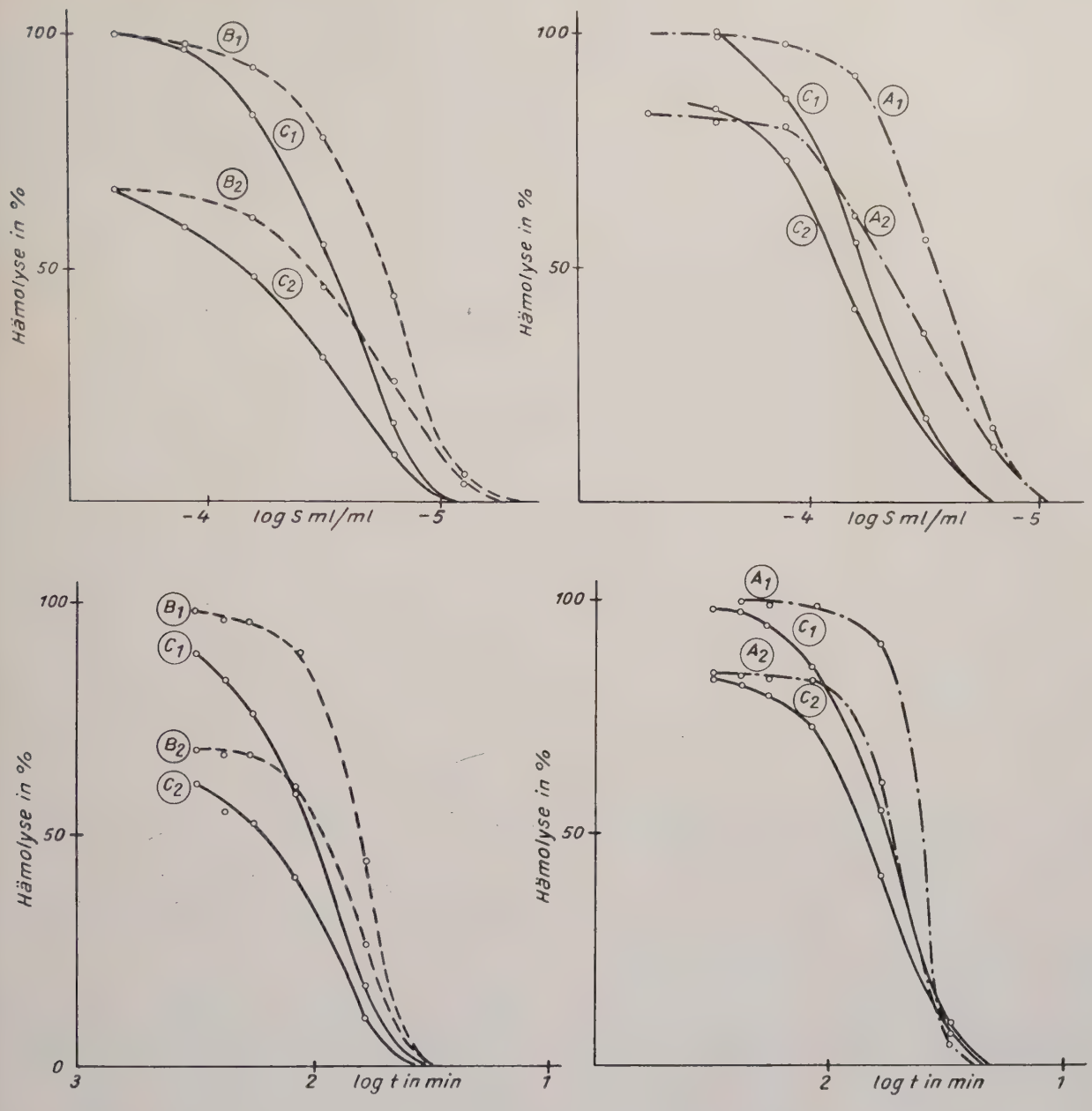


Abb. 59. Einfluß des Hämoglobins auf die S-Hämolyse

Abszisse: log S bzw. log t; Ordinate: Hämolysegrad

Blutsuspensionen von Kaninchen:

$A_{1,2}$ $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml — . — $B_{1,2}$ $2{,}5 \cdot 10^7$ Zellen/ml — — — $C_{1,2}$ $1{,}25 \cdot 10^7$ Zellen/ml · · · ·

Oben: Hämolysegrad/S-Konzentration nach 60 min Hämolysedauer

Unten: Hämolysegrad/Hämolysedauer bei einer S-Konzentration: $1{,}56 \cdot 10^{-5}$ ml S/ml für B, C und $6{,}25 \cdot 10^{-5}$ ml S/ml für A

Die Reihe A und B wurden mit S lyo., die Reihe C mit S_{II} angesetzt. A_2 wurde mit Rinderhämoglobin, B_2 und C_2 mit Kaninchenhämoglobin angesetzt

Erhöhung der hämolytischen Resistenz der Erythrozyten gegenüber der Kontrolle. Bei den mit Glukose vorbehandelten S-Konzentrationen stellt sich jedoch später der gleiche Endwert für die Hämolyse ein. Es kommt also durch Glukose zu einer Veränderung der Hämolysegeschwindigkeit, wie es auch bei Vergleich der 50 %-Hämolysewerte aus mehreren Kurven des Versuchs deutlich wird (Abb. 60 c). Diese Steigerung der „Resistenz" nach 65 min (Abb. 60 b) beträgt fast das Doppelte der S-Konzentration (HC 50 % von 0,50 — 5 auf 0,75 — 5), die Verzögerung der Hämolyse (Abb. 60 a) beträgt bei vergleichbaren Konzentrationen 10 min (HT 50 % 0,66 + 1 auf 0,75 + 1). Diese Versuche zeigen, daß es bei Zusatz von Glukose (10^{-1} mol) zu einer partiellen Hemmung des Staphylolysinzellsystems kommt.

2.7 Die hämolytische Aktivität verschiedener Staphylolysine und der Einfluß der Lagerungstemperatur

In mehreren Versuchen haben wir die hämolytische Potenz von S_{II} und S lyo. miteinander verglichen. Bei

der Gegenüberstellung der HC 50 % aus einem Versuch mit Kaninchenzellen fanden wir das S lyo. fast doppelt so wirksam wie das S_{II} (Abb. 61).

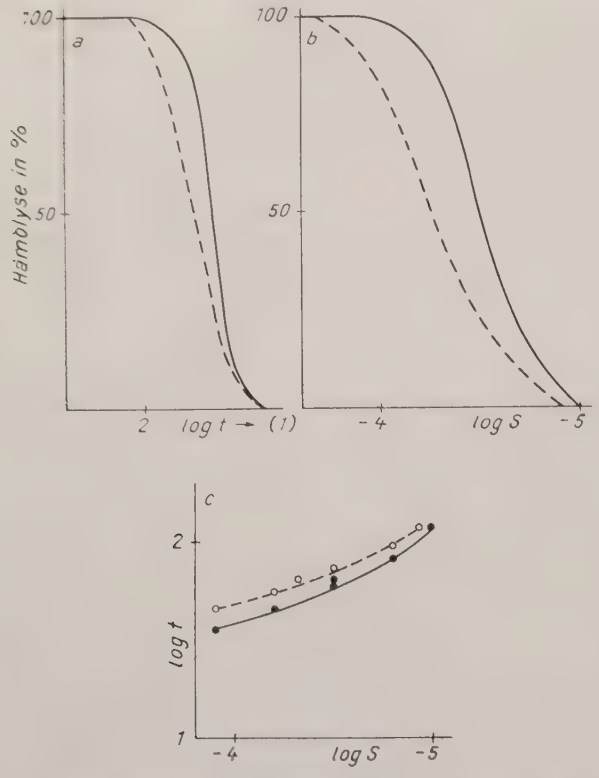


Abb. 60. Einfluß von Glukose auf die S-Hämolyse
Abszisse: log t bzw. log S; Ordinate: Hämolysegrad
Blutsuspension: $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml

a) Hämolysegrad/Zeitkurve der S-Konzentration $6.25 \cdot 10^{-5}$ ml S/ml, ohne —, mit Glukose (10^{-1} m) - - -

b) Hämolysegrad/Konzentrationskurve nach 65 min Einwirkungsdauer, ohne —, mit Glukose (10^{-1} m) - - -

c) Zusammenstellung der HC 50 % und HT 50 % vom Versuch 12. 1. 1960 aus mehreren Hämolysekurven, ohne —, mit Glukose - - -

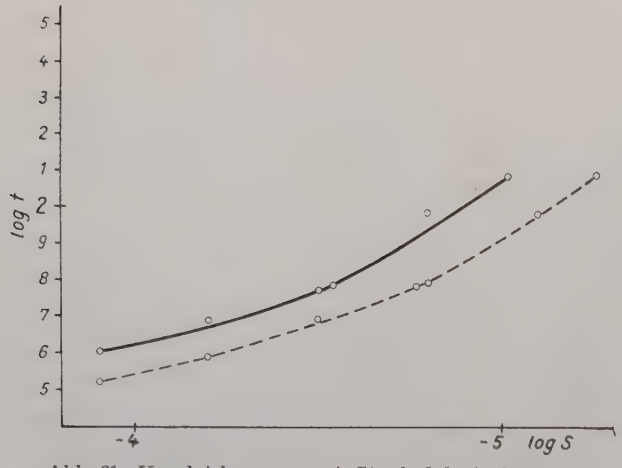


Abb. 61. Vergleich von zwei Staphylolysinchargen
Abszisse: log S; Ordinate: log t
Kurven aus den 50 %-Hämolysewerten vom Versuch 17. 2. 1960
S_{II} —, S lyo. - - -

Auch die verschiedene Lagerungstemperatur beeinflußt das Hämolysevermögen von S. Aus vergleichenden Untersuchungen wurden die Zeit/Konzentrationskurven von bei verschiedener Temperatur gelagertem S_{II} — inzwischen war es 7,5 Monate alt — erhalten (Abb. 62). Die geringere hämolytische Aktivität bei Lagerung bei +2 und +20 °C ist eindeutig. Unter ver-

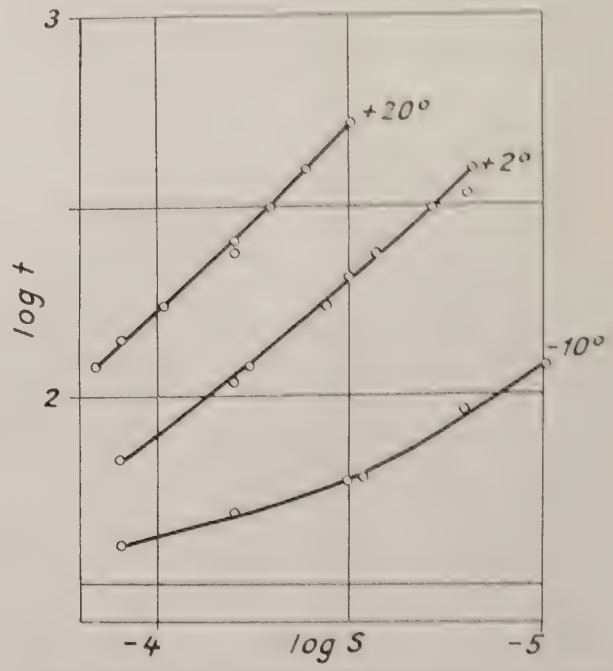


Abb. 62. Einfluß der Lagerungstemperatur auf die hämolytische Aktivität von S_{II}
Abszisse: log S; Ordinate: log t
Kurven aus den 50 %-Hämolysewerten des Versuchs vom 17. 2. 1960 von S_{II} −10 °C, +2 °C und +20 °C nach 7,5monatiger Lagerung

gleichbaren Bedingungen ist das Verhältnis der hämolytischen Potenzen (Konzentrationen), des bei −10, +2 und +20 °C gelagerten S nach einer Einwirkungsdauer von 125 min, wenn man S −10 °C gleich 1 setzt:

S −10 °C	S +2 °C	S +20 °C
1	6,4	15,1

Die Abnahme der hämolytischen Aktivität durch Lagerung bei höherer Temperatur drückt sich in der größeren Steigung der Zeit/Konzentrationskurven von bei +2 und +20 °C gelagertem S aus. Die flacher verlaufende Kurve des −10 °C S spricht dagegen für die hohe hämolytische Potenz.

Zusammenfassung der Befunde IV, 2

Die Versuche zur hämolytischen Wirkung des von uns geprüften S ergeben:

a) Die Empfindlichkeit bei den Zellen der einzelnen Tierarten nimmt ab in der Reihenfolge: Kaninchen, Katze, Rind, Hammel und Ratte.

b) Von einer bestimmten S-Konzentration ab können zwischen Hämolysegrad, Hämolysedauer und Lysinkonzentration bestimmte Beziehungen festgelegt werden.

c) Der Ablauf der Hämolyse bei Kaninchen-, Katzen-, Rinder-, Hammel- und Rattenzellen ist von der Lysinkonzentration abhängig.

d) Die Hämolyse wird bei Kaninchen-, Katzen- und Rattenzellen durch die Zellzahl beeinflußt. Bei Rinder- und Hammelzellen wurde ein Einfluß der Zellzahl nicht beobachtet.

e) Erythrozytenstroma von Kaninchen und Hammel beeinflussen die S-Hämolyse von Kaninchen- und Hammelzellen nicht.

f) Zusatz von Hämoglobin hemmt die S-Hämolyse in der Art, daß die Hämolyse bei hohen Lysinkonzentrationen stärker gehemmt wird als bei niederen.

g) Zusatz von Glukose (10^{-1} mol) hemmt die S-Hämolyse partiell.

h) Für S, das bei $-10\,°C$, $+2\,°C$ und $+20\,°C$ über 7 Monate gelagert war, ergibt sich ein Wirkungsverhältnis von 1 : 6,4 : 15,1.

i) S lyo. war doppelt so hämolytisch aktiv wie S_{II}.

V. Besprechung der Ergebnisse

Eine chemische Differenzierung der Struktur des Staphylokokkentoxins und seiner verschiedenen Komponenten fehlt bisher. Versuche, das Toxin zu reinigen und anzureichern, sind mit geringem Erfolg durchgeführt worden (Burnett und Freemann, 1932; Holt, 1936; Boivin und Izard, 1937; Wittler und Pillemer, 1948; Dworetzky und Mitarbeiter, 1952; Turpin, Relyveld, Pillet und Raynaud, 1954). Chemische Methoden zur Aufarbeitung des Staphylokokken-α-Lysins sind bisher wenig erfolgreich gewesen (Butler, 1959). Nichtsdestoweniger ist dieses Toxin durch seine Antikörper wohl definiert. Neben seiner antigenen Eigenschaft verfügt das Toxin über verschiedene biologische Wirkungen, die auf entsprechende Weise nachgewiesen werden können. Wir haben uns bemüht, in die Vielfalt dieser Wirkungen einzudringen und besonders die pharmakologischen Eigenschaften dieses Toxins kennenzulernen. Die systematische Erforschung der Pharmakologie der Toxine, vor Jahren von Raškova und Mitarbeitern begonnen, erfährt damit einen weiteren Beitrag. Unsere Forschung hatte das Ziel, einmal die verschiedenen Wirkungsparameter vergleichend für ein und dieselbe Toxincharge gegenüberzustellen und zum anderen mit den pharmakologischen Untersuchungen Licht in die Pharmakodynamik der Staphylokokkentoxinwirkung zu bringen. Außerdem hofften wir, auf Grund gleicher pharmakologischer Wirkungen verschiedener Staphylolysine auch im Zusammenhang mit den Angaben aus der Literatur indirekt Hinweise dafür zu erhalten, daß es sich vom chemischen Standpunkt aus gesehen bei den von uns benutzten Toxinen um analoge Produkte handelte.

Um uns ein verständliches und anschauliches Bild von der Verschiedenheit der Wirkungen des Staphylokokkentoxins zu machen, soll sich in der Diskussion unserer Befunde die Systematik der Versuche widerspiegeln. Wir werden daher zunächst unsere Ergebnisse in Verbindung bringen mit den pharmakologischen Wirkungen, die andere Autoren schon vor uns beobachtet haben. Danach erfolgt die Besprechung der Wirkungen an den verschiedenen glattmuskulären Organen, Herzen und Gefäßen im Hinblick auf ähnliche Wirkungen mit anderen Körpern (biogene Amine, Toxine, Polypeptide usw.). Nach Bemerkungen über die hämolytische und letale Wirkung des Toxins und ihre Beziehung zur pharmakologischen Wirkung wollen wir versuchen, in den Schlußbetrachtungen unsere Vorstellungen über einen möglichen Wirkungsmechanismus des Toxins darzulegen. Eine vergleichende Betrachtung der Eigenschaften der von uns benutzten Staphylokokkentoxine soll unsere Untersuchungen abschließen und auch auf das pathophysiologische Geschehen hinweisen.

1. Die Vergleichsmöglichkeiten hinsichtlich pharmakologischer Effekte des von uns benutzten Filtrats von Staphylococcus pyogenes var. aureus (Wood 46) und der Staphylokokkenfiltrate anderer Untersucher sind sehr beschränkt. Diese beziehen sich lediglich auf Wirkungen am Meerschweinchen- bzw. Kaninchendarm. Im Vordergrund der Toxinwirkung am Meerschweinchendarm steht die Tonuszunahme, die nach kurzer Latenzzeit einsetzt. Feldberg und Kellaway finden eine Kontraktion mit nachfolgender spontaner Relaxation, Dworetzky und Mitarbeiter eine langsame Muskelverkürzung, die nur bei hohen Dosen zu irreversibler Unempfindlichkeit führt. Brown, Prichard und Quilliam finden nur eine Tonuserhöhung mit maximaler Kontraktur, die durch Persistenz und Unempfindlichkeit auch nach häufigem Spülen gekennzeichnet ist. Diese Untersucher arbeiten also in einem Dosisbereich, in dem eine Reversibilität der durch Staphylokokkentoxin ausgelösten Kontraktur nicht mehr möglich ist. Die von ihnen beschriebenen Charakteristika der S-Reaktion haben daher nur beschränkte Gültigkeit, nämlich für den von ihnen angewandten „hohen" Dosisbereich. Unsere Befunde sind ähnlich denen, die Dworetzky und Mitarbeiter erhalten haben. Diese Untersucher haben wie wir Filtrate von Wood 46 angewandt, während Feldberg seine ersten Versuche mit Extrakten von Staphylokokken durchführte, deren Wirkungen sich mit Filtraten nur bedingt vergleichen lassen. Auch Quilliam und Mitarbeiter untersuchten Filtrate, jedoch von einem anderen Stamm, und halten die Befunde von Dworetzky und Mitarbeiter für durchaus vergleichbar mit den ihren.

Bei allen Untersuchern ist die Tonuserhöhung das Wesentliche der S-Reaktion. Dagegen finden wir schon bei Anwendung kleinerer S-Konzentrationen zunächst nur eine Zunahme der Pendelbewegungen; nach einigen Minuten treten kräftige spontane Kontraktionen und Relaxationen in rhythmischer Folge auf. Dabei kann auch eine verstärkte Tonisierung beobachtet werden. Da wir der Dosisabhängigkeit der Reaktion mehr Beachtung schenkten und darüber hinaus auch kleinere Toxinmengen länger einwirken ließen, konnten wir Verhaltensweisen erkennen, die andere Untersucher bisher nicht beschrieben haben. Damit können wir die Toxinwirkung am Meerschweinchen-Ileum etwas eingehender charakterisieren.

Am Kaninchendarm finden alle Untersucher (Anderson und Mitarbeiter, Kelsay und Hobbs sowie Quilliam und Mitarbeiter) mit der nach kurzer Latenzzeit einsetzenden Verkürzung des Muskels eine Abnahme der

Darmmotilität. Diese Befunde entsprechen auch den Wirkungen unseres Staphylokokkentoxins, während Richmond und Mitarbeiter neben der nur mäßigen Tonuserhöhung ihrer Filtrate noch eine Verstärkung der Motilität sahen. Diese Ergebnisse können wir nur mit Vorbehalt berücksichtigen, da unzulängliche Versuchsmethodik (keine Angabe des Hämolysetiters für Vergleichszwecke, keine Kontrollen mit Testsubstanzen u. a.) die Aussagekraft dieser Befunde sehr einschränkt. Die S-Reaktion am Kaninchen-Duodenum scheint nach den bisherigen Untersuchungen irreversibel. Da wir an diesem Organ nur in einem engen Dosisbereich gearbeitet haben, können wir dazu nicht Stellung nehmen.

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit wäre in den von anderen Untersuchern und uns angewandten Toxinkonzentrationen gegeben. Die Uneinheitlichkeit in der Wahl des Bezugssystems macht einen Vergleich aber sehr schwierig. So werden Toxinmengen in ml (Feldberg und Mitarbeiter, Richmond und Mitarbeiter), hämolytische Einheiten/ml Bad (Anderson und Mitarbeiter, Kelsay und Hobbs, Quilliam und Mitarbeiter) und Proteinstickstoff in mg/ml (Dworetzky und Mitarbeiter) angegeben. Nur mit Quilliam und Mitarbeitern können wir feststellen, daß die Empfindlichkeit für das Meerschweinchen-Ileum und den Kaninchendarm auf S im gleichen Dosisbereich liegt. Kelsay und Hobbs weisen darauf hin, daß die Zeit zwischen der Filtratapplikation und dem Aufhören der Darmbewegungen sich entgegengesetzt verändert wie der α-Lysintiter. Besonders gut ließ sich diese Tatsache mit Filtraten von Wood 46 demonstrieren, die ausschließlich α-Lysin ohne β-Lysin (Kelsay und Hobbs) enthielten. Die dosisabhängige Reaktion fanden wir, wie auch Dworetzky und Mitarbeiter, am Meerschweinchen-Ileum ebenfalls mit Staphylokokkentoxin (Wood 46).

Trotz der Verschiedenheit der Herstellung der einzelnen Toxine ließen sich mit Filtraten von α-Toxin-bildenden Stämmen qualitativ ähnliche Reaktionen von allen Untersuchern erzeugen. Das von uns benutzte Staphylokokkentoxin entspricht in bezug auf pharmakologische Wirkung den Effekten α-lytischer Fraktionen. Eine Abgrenzung gegen β-Toxin, das zu einer Tonusherabsetzung (am Kaninchendarm) führt, ist damit ebenfalls gegeben. Eine Abgrenzung gegenüber Enterotoxin soll weiter unten besprochen werden.

2. Betrachtet man summarisch die Toxinwirkungen an den von uns untersuchten Organen, so mag der Eindruck entstehen, daß es sich im Grunde genommen immer um gleiche Reaktionsweisen auf das Staphylokokkentoxin handelt. Diese Betrachtungsweise sagt jedoch nichts über die verschiedene Suszeptibilität der Organe gegenüber Pharmaka und S, über die Unterschiede in der Wirkung an den einzelnen Organen usw. und scheint uns daher unzureichend. Die S-Reaktion am Kaninchen-Duodenum und am Meerschweinchen-Ileum zum Beispiel äußert sich in einer Tonuszunahme. Dieser geht beim Meerschweinchen-Ileum bei empfindlicher Registrierung eine Zunahme der Motilität sofort nach Applikation des Toxins voraus, beim Kaninchen-Duodenum dagegen kommt es zur Abnahme der Pendelbewegungen. Danach sind bei beiden Organen zwei Wirkungskomponenten zu unterscheiden, die nach einer verschieden langen Latenz in Erscheinung treten. Die eine beeinflußt die Motilität des Organs in exzitatorischer bzw. inhibitorischer Beziehung, während die andere eine Veränderung des Tonus des Organs bewirkt. Ob es sich hierbei um voneinander unabhängige Effekte handelt oder nicht, soll zunächst an einem Organ, das morphologisch einfacher als der Darm ist, besprochen werden. Die ausführlichen Versuche am Uterus der Ratte bieten uns dazu Gelegenheit.

Das Fehlen eines lokalen Nervenplexus im Ratten-Uterus darf in Analogie zu den Verhältnissen beim Menschen angenommen werden. Bisher konnte man keine intramuralen Ganglien nachweisen. Diese Tatsache läßt den Uterus für das Studium muskulotroper Wirkungen besonders geeignet erscheinen, darüber hinaus eröffnet die selektive Empfindlichkeit des Ratten-Uterus auf Serotonin und Acetylcholin und die völlige Unempfindlichkeit auf Histamin Möglichkeiten der pharmakologischen Differenzierung. Die Reaktion am Ratten-Uterus auf Staphylokokkentoxin ist charakterisiert durch:

a) eine dosisabhängige gut bestimmbare Latenzperiode zwischen der Applikation des Toxins und dem Beginn der Reaktion;
b) eine dosisabhängige Reaktion, die bei niederen Dosen zu verstärkten Spontankontraktionen ohne deutliche Tonisierung führt, bei hohen Dosen zu einer langsam zunehmenden Tonisierung nach mehreren Minuten. Diese kann dann in eine maximale Kontraktur übergehen. Mittlere Dosen zeigen verstärkt Kontraktionen bei mäßiger Tonisierung;
c) durch die Reversibilität der Reaktion nach kleineren Dosen und der irreversiblen Unempfindlichkeit des Organs nach großen Dosen Toxin.

Da die Reaktion der isolierten Organe auf S nicht sofort nach Applikation des Toxins, sondern immer erst nach einer bestimmten Latenzzeit einsetzt (Feldberg, Dworetzky, Quilliam, Kelsay usw.), drängt sich die Frage in den Vordergrund, was am Uterus unter der Toxineinwirkung in dieser ersten Phase nach der Applikation geschieht. In der Badflüssigkeit tritt eine Substanz auf, die nach Erreichen einer bestimmten Schwellenkonzentration den Uterusmuskel erregt. Diese für den Ablauf der Reaktion notwendige Konzentration wird in einem Zeitraum, der bei einer bestimmten Toxindosis länger als 2 min dauert, gebildet, wie die von uns durchgeführten Auswaschversuche während der Latenzperiode zeigen. Die von uns vermutete Substanz, oder auch Substanzen, die den Uterusmuskel zu verstärkten Kontraktionen, darüber hinaus auch zur Tonisierung bringen, können aus dem Toxin stammen. Es ist indessen aber auch möglich, die Bildung und Freisetzung eines muskelstimulierenden Prinzips aus dem Uterus durch das Toxin anzunehmen.

Welche Stoffe natürlichen Ursprungs haben die Eigenschaft, die Muskulatur des Uterus zu erregen und diesen zu Kontraktionen zu veranlassen? Zunächst die verhältnismäßig einfach gebauten Amine, wie Histamine, Acetylcholin, Serotonin, aber auch unter bestimmten Bedingungen Adrenalin und Nor-Adrenalin, weiter Adenosinverbindungen, die Alkaloide des Mutterkorns und eine Reihe von Polypeptiden. Dabei

sind besonders die beiden seit einiger Zeit in ihrer Struktur bekannten Hormone des Hypophysenhinterlappens Oxytocin und Vasopressin hervorzuheben. Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang auch auf ein sogenanntes „Gewebshormon" mit oxytocischer Wirkung: Pepsitocin (Croxatto und Mitarbeiter, 1951), das durch eine andere Aminosäurensequenz vom Oxytocin unterschieden ist (Tuppy, 1956).

Der Ratten-Uterus ist empfindlich nur auf eine Reihe der oben genannten Stoffe. Histamin können wir von vornherein ausschließen, ebenso auch Adrenalin und Nor-Adrenalin, die am Ratten-Uterus spasmolytisch wirken. Die anderen Verbindungen sind ebenfalls für die Vorstellung der S-Wirkung zu vernachlässigen. Für unsere Experimente kommen somit nur Acetylcholin, Serotonin und eventuell Stoffe, die in Beziehung zu den gewebseigenen Polypeptiden stehen, für eine kontraktionserregende Wirkung in Betracht. Dabei wollen wir nicht übersehen, daß in unseren Versuchen am Ratten-Uterus auch das Kulturmedium des Staphylokokkentoxins den Uterus zu kontrahieren in der Lage war. Feldberg und Keogh haben am Meerschweinchen-Ileum auch einen stimulierenden Effekt des Mediums beschrieben. Raškova und Mitarbeiter (1957) konnten mit Streptolysin 0, einem extrazellulären Produkt von Streptokokkenkulturen, den Ratten-Uterus zur Kontraktion bringen. Diese Reaktion hat gewisse Ähnlichkeit mit der durch S ausgelösten Kontraktion am Ratten-Uterus; diese wurde durch Atropin und Antihistamin nicht beeinflußt. Durch LSD wurde die Streptolysinkontraktion nur gering reduziert.

Der Verlauf der S-Wirkung am Ratten-Uterus, d. h. das Auftreten einer Latenzzeit vor der eigentlich sichtbaren Reaktion, ließ eine Wirkung von Acetylcholin, Serotonin und auch des Kulturmediums ausschließen. Wir konnten zeigen, daß entsprechende Mengen des Kulturmediums unmittelbar nach Applikation zu einer plötzlichen Kontraktion führten. Gaben mehrmals hintereinander veränderten niemals die Empfindlichkeit des Organs auf Acetylcholin, Serotonin, Kulturmedium und Staphylokokkentoxin. Die Kontraktion war gut auswaschbar, atropinresistent, jedoch stark LSD-empfindlich. Somit kommt das Kulturmedium als Ursache für die S-Wirkung am Ratten-Uterus nicht in Frage. Das gleiche gilt auch für das Acetylcholin, da wir weder mit Atropin noch mit Prostigmin die S-Wirkung in irgendeiner Weise verändern konnten. Überraschenderweise konnten wir jedoch mit spezifischen Serotoninantagonisten die S-Reaktion beeinflussen. Die Vorbehandlung der Ratten-Uteri mit LSD führte zur Aufhebung der Serotoninkontraktion (Gaddum, 1953) und zu einer Abschwächung der S-Reaktion. Einerseits kam es durch Verlängerung der Latenzzeit zu einem verzögerten Ablauf, andererseits zu Hemmung und fast völliger Unterdrückung der durch S bedingten Tonisierung. Mit dem Cycloalkylamid der d-Lysergsäure CEPENTYL, ebenfalls einem spezifischen Serotoninantagonisten, konnten wir bei Anwendung 5mal höherer Konzentrationen als LSD in gleicher Weise Kontraktionen mittlerer und höherer Dosen von S hemmen, Reaktionen kleinerer S-Mengen völlig blockieren.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß Serotonin bei der S-Wirkung am Ratten-Uterus eine Rolle spielt. Wenn das so ist, müßte man mit Serotonin bei Anwendung verschiedener Konzentrationen qualitativ unterschiedliche Reaktionsbilder wie bei der S-Wirkung erhalten. Tatsächlich kam Busch (1956) bei ihren Untersuchungen am Ratten-Uterus zu der Feststellung, daß kleinere Dosen Serotonin zu einer Frequenzvermehrung und Amplitudenvergrößerung, größere Dosen zu einer Tonuserhöhung führen. Da der Ratten-Uterus schon auf Serotoninmengen von 10^{-8} g/ml anspricht, können wir annehmen, daß die bei der S-Wirkung auftretenden kleinen Mengen Serotonin sicher in dieser Größenordnung liegen.

Serotonin konnte in den letzten Jahren in einer Reihe von Geweben nachgewiesen werden. Es findet sich u. a. in den Lungen, im Magen, in der Milz, in den Zellen des enterochromaffinen Gewebes der Darmmucosa, in den Blutplättchen und wurde auch in einigen zentralnervösen Strukturen gefunden. Den glatten Muskel zu erregen ist eine der bekannten Eigenschaften des Serotonins. Serotonin veranlaßt Kontraktionen am Uterus, Duodenum und Kolon von Ratten, am Uterus, Duodenum und Jejunum von Kaninchen und am Duodenum, Ileum, Jejunum von Meerschweinchen. Von Serotonin werden die Gefäße des isolierten Kaninchenohres stark kontrahiert, isolierte Herzen von Mollusken stark erregt. Organe mit hoher Serotoninempfindlichkeit sind der Ratten-Uterus (Erspamer, 1952), das Meerschweinchen-Ileum (Gaddum, 1953; Robertson, 1953; Rocha e Silva, Valle und Picarelli, 1953), das Kolon der Ratte (Feldberg und Toh, 1953), das Kaninchenohr (Rapport, Green und Page, 1948) und der isolierte Magenstreifen der Ratte (Vane, 1957).

In eingehenden Studien zeigten Parrat und West (1957), daß in den Mastzellen des Gewebes von Meerschweinchen, Kaninchen, Menschen, Hunden, Rindern, Katzen u. a. Serotonin nicht konzentriert wird, obgleich es in den Mastzellen von Ratten und Mäusen in größerer Menge angetroffen werden kann. Über die Hälfte des gesamten Serotonins findet sich bei Ratte und Maus in der Haut. Ursprünglich hatte man angenommen, daß das Vorkommen von Serotonin an Mastzellen gebunden ist (Benditt, Wong, Arase, Roeper, 1955; Battacharya und Lewis, 1956; Parrat und West, 1956; Rowley und Benditt, 1956). Es ließ sich aber zeigen, daß man aus dem Rattengewebe Serotonin freisetzen kann, ohne die Mastzellen und das Gewebshistamin zu beeinflussen, umgekehrt aber können Histamin freigesetzt und Mastzellen zerstört werden, wobei der Serotoningehalt des Gewebes meist unverändert bleibt. Die Serotoninfreisetzung ist also unabhängig von der Histaminfreisetzung (Parrat und West, 1957). Diese Befunde an der Ratte sind jedoch nicht ohne weiteres anwendbar auf andere Tierarten, und von verschiedener Seite wird auf die Gefahr hingewiesen, Befunde an einer Spezies auf andere zu übertragen (Sparrow und Wilhelm, 1957; West, 1959) bzw. diese zu verallgemeinern.

Wenn auch die Bedeutung und vor allem die physiologische Funktion von Serotonin nicht klar ist, so scheint es doch nahezu sicher, daß Serotonin in wechselnder Menge fast in allen Geweben vorhanden sein kann. Über die „Intrinsic Activity" des Serotonins vom Uterus der Ratte ist wenig bekannt.

Uteri von Ratten, denen vor der Tötung Serotonin in nicht geringen Mengen zugeführt wurde, enthielten 5—10 µg/g Serotonin (Udenfriend, 1958). Das heißt also, daß Serotonin auch im Uterus gespeichert und gebunden werden kann.

Wenn das Serotonin bei der S-Reaktion am Ratten-Uterus eine wichtige Rolle spielt, taucht die Frage auf, ob an anderen isolierten Organen die Verhältnisse ähnlich liegen, d. h. kann man aus unseren Experimenten am Meerschweinchen-Ileum, Magenstreifen und Kolon der Ratte, am isolierten Kaninchenohr u. a. auf Serotonin-ähnliche Reaktionen schließen.

Die Beziehungen des Serotonins zum peristaltischen Reflex in der Darmmotorik werden schon seit längerer Zeit von verschiedener Seite diskutiert. So nimmt Lembeck (1953, 1954) an, daß das Sekretionsprodukt des enterochromaffinen Gewebes, das Serotonin, auf die Neuronen des Meißnerschen Plexus als „physiologischer Stimulus" für die intestinale Motilität wirkt. Ginzel (1957), Kosterlitz und Robinson (1957) konnten mit Serotonin eine Hemmung der Peristaltik am Meerschweinchen-Ileum beobachten, während Bülbring und Mitarbeiter (1958) bei Gabe von Serotonin intraluminal den entgegengesetzten Effekt beobachteten. Außerdem fanden diese Autoren bei Zugabe von 5-Hydroxytryptophan, aus dem durch Decarboxylierung Serotonin entsteht, eine vermehrte Produktion von Serotonin in der Darmwand während der peristaltischen Aktivität. Damit wurde die Möglichkeit einer Freisetzung von Serotonin als Ergebnis motorischer Aktivität nicht ausgeschlossen. Bülbring ist der Ansicht, daß Serotonin bei Gabe ins Darmlumen die sensorischen Rezeptoren der Darmmucosa erregt, bei Gabe auf die Serosa des Darms die Überträgerfunktion des Acetylcholins sensibilisiert. Diese Ansicht äußerten Rocha e Silva und Mitarbeiter in ähnlicher Form schon 1953, indem er eine primäre spezifische Wirkung des Serotonins auf Acetylcholinrezeptoren, aber auch auf postganglionäre cholinergische Fasern für möglich hielt. Diese Autoren schlossen aus der starken Beeinflussung der Serotoninkontraktion durch Atropin auf eine parasympathikomimetische bzw. cholinergische Natur der Serotoninwirkung. Die Wirkung des Serotonins auf die nervösen Strukturen des Darms nehmen auch Robertson (1953), Gaddum und Hameed (1954) sowie Garven (1956) an. Gaddum und Picarelli (1957) untersuchten die Wirkung von Serotonin und einiger Antagonisten am glatten Muskel und an den peripheren nervösen Strukturen. Sie fanden am Meerschweinchen-Ileum Dibenzylin (N-2-phenoxyisopropyl-N-β-chloräthylbenzylamin), Derivate des Mutterkorns und auch LSD antagonistisch wirksam gegenüber Serotonin. Als starke Antagonisten des Serotonins erwiesen sich Pharmaka wie Atropin, Morphin und Kokain, die am Ratten-Uterus gegenüber Serotonin keinen Antagonismus zeigten. Gaddum nimmt entsprechend der unterschiedlich antagonistischen Wirkung der eben genannten Pharmaka zwei Arten von „Tryptaminrezeptoren" an. Die einen liegen in der glatten Muskulatur sowohl des Meerschweinchen-Ileums und des Ratten-Uterus und werden Serotonin-unempfindlich durch Dibenzylin, LSD u. a., während die anderen Rezeptoren teilhaben an der nervösen Struktur z. B. des Meerschweinchen-Ileums und durch Atropin, Morphin u. a. Serotonin-unempfindlich werden. Hervorzuheben ist bezüglich unserer Versuche der Hinweis (Gaddum), daß LSD auch bei Anwendung hoher Konzentrationen am Meerschweinchen-Ileum nur eine sehr schwache Antiserotoninwirkung im Vergleich zum Ratten-Uterus zeigt. Da wir in unseren Versuchen am Meerschweinchen-Ileum mit LSD oft eine heftige, aber reversible Kontraktion (Picarelli) erhielten, war die Prüfung des Serotonin-antagonistischen Effekts erschwert. Bülbring und Crema betonen, daß Serotonin das Meerschweinchen-Ileum für Acetylcholin (Überträgerrolle!) empfindlich macht, damit ist das verstärkte Auftreten von Pendelbewegungen und starken spontanen Kontraktionen der Längsmuskelschicht, die durch Atropin gehemmt werden können, verbunden.

Das Meerschweinchen-Ileum wird nach Gaben von Staphylokokkentoxin zu einer rhythmischen Tätigkeit angeregt. Diese auf eine Serotoninfreisetzung zurückzuführen und damit verbunden eine Erregung cholinergischer Strukturen, scheint naheliegend, da in unseren Versuchen Atropin diese Effekte unterdrücken konnte, während Atropin am Ratten-Uterus infolge Fehlens geeigneter Strukturen unwirksam blieb. Dafür war an diesem Organ LSD sehr wirksam durch Angriff am muskulären Rezeptorenapparat, weniger eindeutig dagegen am Meerschweinchen-Ileum.

Das regelmäßig und recht empfindliche Reagieren auf Staphylokokkentoxin bei Organen, die sich durch hohe Serotoninempfindlichkeit auszeichnen, scheint uns kein Beweis, jedoch aber ein Hinweis zu sein, daß einer serotoninähnlichen Reaktion bei der Staphylokokkentoxinwirkung Bedeutung beizumessen ist. Das gilt besonders für den Magenstreifen (Vane) und das Kolon der Ratte (Dalgliesh, Toh und Work, 1953), auch mit der Einschränkung, daß mit LSD die S-Reaktionen nicht bzw. nur wenig zu beeinflussen waren (siehe oben).

Für eine Serotoninwirkung im Verlauf einer S-Reaktion sprechen ebenfalls die Befunde am Kaninchenohr. Wie auch bei einem Teil unserer anderen Befunde stützen wir unsere Behauptung durch einen indirekten Beweis. Nach den Versuchen von Feldberg und Mitarbeitern, die Lungen und Leber von Hunden, Meerschweinchen und Katzen mit Staphylokokkentoxin durchströmten und eine starke Histaminfreisetzung feststellten, waren wir zunächst überrascht, daß wir keine Gefäßerweiterung (Histamin) beobachten konnten. Damit schien also die Freisetzung von Histamin bei der Einwirkung von S auf die Gefäße des Kaninchenohres eine untergeordnete oder sekundäre Rolle zu spielen. Diese Ansicht fand Unterstützung in Experimenten von Raškova, Waitzova und Sobek (1959), die an Durchströmungspräparaten mit Streptolysin 0 nur Verengerungen der Gefäße fanden. Diese Effekte ließen sich durch LSD bzw. Cepentyl antagonisieren. Die Autoren weisen darauf hin, daß „die Wirkung von Serotonin exakt die gleiche war, wie nach Applikation von Streptolysin 0". Diese Befunde sprechen dafür, daß Streptolysin 0 im perfundierten Kaninchenohr auch andere Stoffe freisetzt als Histamin. Ähnliche Mechanismen für die Wirkung von S am isolierten Kaninchenohr werden von uns angenommen. In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, daß kleinere

Dosen von S, mehrmals hintereinander gegeben, zu einer Vasokonstriktion führten. Erst bei höheren Dosen, die für mehrere Minuten einen Durchflußstopp bewirken, fanden wir nach Normalisierung der Perfusion eine langsame Zunahme der Perfusionsmenge. Damit deutete sich also eine allmähliche Gefäßerweiterung an. Diese kann entsprechend der Befunde von Feldberg die Folge einer Histaminfreisetzung sein. Inwieweit diese auf das Toxin zurückgeführt werden kann, ist nicht zu entscheiden, da von verschiedenen Autoren (Feldberg u. Smith, 1953, 1954; Rowley u. Benditt, 1956; Sparrow u. Wilhelm, 1957) auch eine histaminfreisetzende Fähigkeit von Serotonin für möglich gehalten wird. Die damit in Zusammenhang stehende recht reichliche Ödembildung kann als Folge der permeabilitätsfördernden Wirkung von Serotonin und Histamin (Parrat u. West, 1958) nach Kapillarschädigung angesehen werden. Rowley u. Benditt fanden bei äquivalenter Ödembildung Serotonin 200mal stärker wirksam als Histamin. Aus den angeführten Tatsachen ist zu entnehmen, daß Adrenalin, ebenfalls ein starker Vasokonstriktor am Kaninchenohr (Ginzel u. Kottegoda, 1953), auch im Hinblick auf die Versuche an anderen isolierten Organen, keine Bedeutung für die S-Wirkung zukommt. Vasokonstriktion und Ödembildung am Kaninchenohr deuten auf einen serotoninähnlichen Mechanismus.

Die bisher durchgeführte Betrachtung zum Wirkungsprinzip von S an glattmuskulären Organen ist von der Annahme ausgegangen, daß die Erregung des glatten Muskels durch eine Substanz erfolgt, die aus dem Gewebe freigesetzt wird. Dabei stellen unsere Versuche das Serotonin in den Vordergrund, das am Uterus der Ratte ziemlich wesentlich für die glattmuskuläre Stimulation durch das Toxin ist. Indessen ist die Frage nicht beantwortet, ob das Serotonin Bestandteil des Toxins ist und weiterhin, ob das Serotonin allein für die muskelerregende Wirkung am isolierten Organ verantwortlich ist.

Die Herkunft des Serotonins aus dem Toxin selbst erscheint unwahrscheinlich, da das Toxin sogar in hohen Konzentrationen das isolierte Herz von Helix pomatia, das mit hoher Spezifität auf Serotonin reagiert, unbeeinflußt läßt. Ein weiterer Beweis hierfür ist, daß erhitzte Filtrate pharmakologisch inaktiv sind, also ein relativ thermostabiles Serotonin nicht enthalten können. Das Einsetzen der S-Wirkung nach einer bestimmten Latenzzeit macht wahrscheinlich, daß durch das Toxin die muskelstimulierende Substanz (z. B. Serotonin) aus dem isolierten Organ freigesetzt wird; wird eine bestimmte Schwellenkonzentration erreicht, läuft die Reaktion ab.

Das den glatten Muskel erregende Prinzip allein vom Serotonin abhängig zu machen, geht aus unseren Versuchen nicht hervor. Mehrere Befunde können dafür herangezogen werden, wie z. B. das Reagieren von Organen mit geringer Serotoninempfindlichkeit (Uterus des Meerschweinchens), die unvollständige Antagonisierung durch spezifische Serotoninantagonisten, auch bei ausreichender Dosierung (am Uterus der Ratte), die vollständige Antagonisierung durch Serotoninantagonisten wie Chlorpromazin und Reserpin, die fehlende Antagonisierung an anderen isolierten Organen durch LSD usw. Das heißt also, die muskelstimulierende Wirkung ist nur zum Teil durch Serotonin bedingt. Schon am Kaninchenohr haben wir neben der Serotoninausschüttung eine mögliche Freisetzung von Histamin diskutiert. Dieser kann natürlich bei den mehr für Histamin empfindlichen Organen Bedeutung beigemessen werden. In Verbindung mit den Toxinwirkungen am Meerschweinchen-Ileum, das gut auf Histamin anspricht, haben Quilliam und Mitarbeiter gezeigt, daß eine Hemmung der Toxinreaktion mit dem Antihistamin Mepyramin (Neoantergan) nur zum Teil möglich war. Die von Quilliam angewandte Antihistamindosis von $6{,}7 \cdot 10^{-6}$ g/ml wäre bei weitem ausreichend, um eine Histaminwirkung vollständig zu blockieren (Gaddum u. Hameed). Somit kann die tonisierende Wirkung am Meerschweinchen-Ileum nicht allein durch Histamin oder Serotonin bedingt sein, sondern es ist noch ein anderer muskelerregender Stoff zu vermuten. Entsprechend unserer Beobachtung am Meerschweinchen-Ileum bringen wir die von uns zuerst beobachtete atropinempfindliche Komponente, die rhythmische Kontraktionen auslöst entsprechend Bülbring, Rocha e Silva, Gaddum u. a., mit einer Serotoninfreisetzung in Verbindung. Die andere Komponente aber, die zu einer Tonisierung der Längsmuskulatur führt, konnten wir durch Antagonisten nicht beeinflussen, im Gegensatz zu Quilliam, der in Anwesenheit von Papaverin diese völlig unterdrücken konnte. Die antagonisierende Wirkung des Adrenalins am Uterus der Ratte gewinnt in Zusammenhang mit diesen Befunden Bedeutung, und wir schließen daraus, wie auch aus einer Reihe anderer bereits erwähnter Befunde, daß neben Serotonin noch eine andere Substanz auftritt, die vornehmlich die Tonisierung der Organe bedingt und muskulär angreift. Diese Substanz steht wirkungsmäßig in enger Beziehung zu der von Feldberg beschriebenen „Slow reacting Substance".

Man versteht darunter eine Reihe von Substanzen, die nach einer Latenzzeit den glatten Muskel (Meerschweinchendarm oder Kaninchendarm) langsam kontrahieren und nach dem Auswaschen zu einer verzögerten Relaxation führen. Eine Beteiligung von Histamin, Acetylcholin, Serotonin am Wirkungsbild kann dabei ausgeschlossen werden. Ihrer chemischen Struktur nach soll es sich um ungesättigte Fettsäurefraktionen (Gabr, 1956; Vogt, 1956) handeln, die unter verschiedenen Bedingungen (z. B. Hydrolyse von Lecithin) gebildet werden. Auch der „Darmstoff" (Vogt, 1958) ist hier zuzurechnen. Weiter müssen in diesem Zusammenhang die eingangs kurz erwähnten pharmakodynamisch hoch aktiven Polypeptide Berücksichtigung finden, da diese Körper zu ähnlicher Reaktion an glattmuskulären Organen führen können. Ihre Entstehung verdanken die Polypeptide u. a. einem proteolytischen Abbau normaler Serumproteine, sie benötigen also zu ihrer Bildung eiweißspaltende Fermente. Aus der gleichen Eiweißfraktion des Blutserums bei Bebrütung mit Pepsin bzw. Trypsin können entstehen: Pepsitocin, Pepsitensin, Pepsanurin, Bradykinin, Hypertensin u. a. [Hypertensin ist ein Octapeptid (Elliot u. a., 1956), Bradykinin wurde von Elliot und Mitarbeitern (1959) zunächst als Octapeptid angegeben. Boissonnas u. a. konnten indessen beweisen, daß Bradykinin ein Nona-

peptid ist. Die Sequenzen sind unterschieden.] Auch Polypeptide, aus verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten isoliert, erregen die glatte Muskulatur. So fanden Euler u. Gaddum (1931) ein als „Substanz P" bezeichnetes Polypeptid, das gute Effekte auf die Darmmotilität zeigt. Ivy u. Oldberg (1928) isolierten aus der Schleimhaut des Duodenums das Cholezystokinin, das die Gallenblase kontrahiert. Auch die jüngst aufgefundenen Polypeptide, wie „Substanz A" (Walaszek u. Huggins, 1959) und eine Substanz aus den fötalen Anteilen der Placenta (Sisson u. Davies, 1959), sollen Erwähnung finden, ohne in der Aufzählung Vollständigkeit anstreben zu wollen. Schließlich könnten hier auch noch eine Reihe tierischer Gifte angeführt werden, die ebenfalls die glatte Muskulatur „slow" erregen und kontrahieren (Übersicht bei Kaiser u. Michl).

Die Abgrenzung dieser Substanzen, die in ihrer Wirkung einiges gemeinsam mit dem S haben, sehen wir darin, daß nach Erhitzen von S die „Slow-reacting-Wirkung" ausbleibt im Gegensatz zu den Wirkungen der relativ thermostabilen Polypeptide. Ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich bei den Effekten an den isolierten Organen um keine eigentliche (primäre) Toxinwirkung handelt, sondern daß es sekundär zu einer Freisetzung eines glattmuskulär wirksamen Körpers aus den isolierten Organen kommt. Zu den „Slow reacting Substance" müssen wir wirkungsmäßig auch das Streptolysin 0 rechnen. Am Uterus finden wir bei beiden Toxinen nahezu gleiche Reaktionen, die sich jedoch in ihrer Pharmakodynamik unterscheiden (geringere LSD-Empfindlichkeit bei Streptolysin 0, relativ gute Reversibilität der Wirkung von Streptolysin 0).

Kommen wir auf die oben erwähnte unterschiedliche Wirkung des S am Kaninchen- und Meerschweinchendarm zurück, so können wir nun feststellen: Am Meerschweinchen-Ileum ist die Zunahme der Motilität und des Tonus bei der Einwirkung von S an zwei Prinzipien gebunden. Die Erhöhung der Motilität kann auf einen „cholinergischen" Mechanismus des Serotonins, die tonisierende Wirkung auf Freisetzung einer myoaktiven Substanz zurückgeführt werden. Am Kaninchen-Duodenum kommt für die Abnahme der Pendelbewegungen, die als myogen angesehen werden (Bozler, 1948), und die Tonuserhöhung nur das Einwirken der durch das Toxin freigesetzten myoaktiven Substanz in Frage. Ein ähnlicher Mechanismus wie beim Kaninchendarm scheint auch für das Hühner-Coecum denkbar, an dem wir den „bradykininartigen" Effekt durch S gut ausgeprägt fanden.

Wie sind in diesem Zusammenhang die Befunde an isolierten Herzen und Herzstreifen einzuschätzen? Geben die Versuche Anhaltspunkte für bestimmte herzwirksame Mechanismen?

Während einige Toxine, wie das Neurotoxin von Shigellae Shigae oder das Endotoxin von Salmonella Typhi keine Wirkung an isolierten Säugetierherzen (Vaněček, 1955) zeigen, können mit Streptolysin 0 cardiotoxische Effekte am Kaltblüterherz (Bernheimer u. Cantoni, 1945) und am Warmblüterherz (Vaněček, 1956; Bernheimer u. Mitarbeiter, 1956, 1957) beobachtet werden. Auch wir konnten im Staphylokokkentoxin einen herzwirksamen Körper finden, der sich wesentlich von den ausgesprochen toxischen Eigenschaften des Streptolysin 0 unterscheidet. Während Einzelgaben von Streptolysin 0 regelmäßig nach kurzer Zeit zur Abnahme der Amplitude und zum systolischen Herzstillstand führen, konnten wir eine dosisabhängige Reaktion am Kaninchenherzen mit S ausmachen.

Kleinere Dosen zeigten positiv ino- und chronotrope Wirkungen, die reversibel und auswaschbar waren. Höhere Dosen führten zu einer Verstärkung dieser Wirkungen, dabei kam es zu einer mächtigen Vergrößerung der Amplitude; allmählich oder nach kurzer Zeit, je nach Dosis, nahm die Größe der Amplitude wieder ab, und eine negativ inotrope Phase führte zu einer Abnahme der Herztätigkeit. In diesem Zustand reagierten die Herzen nicht mehr auf weitere Gaben Toxin. Große Dosen S führten wie beim Streptolysin 0 schnell zum Verschwinden der Amplitude und zu einer starken Tonisierung der Herzen mit systolischem Herzstillstand. Hühnerherzen zeigten gegenüber Staphylolysin hohe Empfindlichkeit. Inwieweit der hohe Serotoningehalt des Hühnergewebes (Udenfriend u. a., 1958) hierbei eine Rolle spielt, ist von uns nicht zu übersehen. Herzen von Mollusken sprachen dagegen auf wiederholte Gaben von Toxin auch in hoher Dosierung nicht an. Isolierte Herzvorhofstreifen von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte waren weniger empfindlich auf Staphylolysin. Wir beobachten positiv und negativ inotrope Effekte, jedoch waren große Konzentrationen des Toxins nicht in der Lage, toxische Wirkungen hervorzurufen. Die Toxinreaktion an den Herzstreifen war stets auswaschbar und reversibel.

Im Vordergrund der S-Wirkung am Herzen stehen die muskelstimulierenden Effekte. Die bei höheren Dosen nach einer gewissen Latenzzeit auftretende negativ inotrope Wirkung mit Abnahme der Amplitude spricht für eine serotoninähnliche Reaktion. In sehr eindeutigen Versuchen konnten nämlich Meier, Tripod u. Studer (1958) zeigen, daß geringe Serotoninmengen am isolierten Herzen des Kaninchens bei positiv chronotroper Wirkung und Dilatation des Koronarkreislaufes zur Amplitudenverkleinerung führen. Dieses Phänomen tritt nach Serotonin nur am isolierten Herz von Kaninchen auf. Die starke Tonisierung nach hohen S-Dosen könnte wieder in Verbindung mit einer „Slow reacting Substance" gebracht werden.

Wichtig erscheint uns die relative Unempfindlichkeit der Herzvorhofstreifen auf Toxin gegenüber den isolierten Herzen. Das könnte auf ein Überwiegen von Angriffspunkten hindeuten, die mehr im Ventrikel- und Gefäßsystem des Herzens zu suchen sind, d. h. Einwirkung von S auf myogene Strukturen des Herzmuskels und der Herzgefäße.[4]

Abschließend sei hervorgehoben, daß S bei hoher Dosierung zum Herzstillstand in der Systole führt. Enterotoxin dagegen bringt das isolierte Katzenherz zum diastolischen Stillstand (Stolmakova).

2. Die Staphylolysinhämolyse ist eine der sogenannten „langsamen" Hämolysen. Dieser Umstand ermöglichte es, mit der von uns geübten Methode zu

[4] Inzwischen konnte gefunden werden, daß S die Koronarien des Meerschweinchenherzens stark verengert (Wiegershausen, unveröffentlicht).

einigen Feststellungen über diese Hämolyse zu kommen. Um bestimmte ausgezeichnete Hämolysewerte zu erreichen, bedurfte es bei der S-Hämolyse einer Latenzzeit, die in Abhängigkeit von der Zellart < 30 min und > 60 min dauern konnte. Hierin unterscheidet sich die Hämolyse von der Lysolecithinhämolyse, die, wie JUNG (1959) kürzlich feststellen konnte, noch „bei den höchsten wirksamen Verdünnungen sehr schnell" ablief.

Zunächst sei betont, daß die von uns vorgelegten Hämolysekurven Reaktionsabläufe zwischen Toxin und Zelle darstellen; es handelt sich jedoch bei unseren Versuchen nicht um eine „Etude cinétique", wie MANGALO und RAYNAUD diese Untersuchungen bezeichnen würden. Weiterhin sei hervorgehoben, daß wir unsere Hämolyseversuche mit definierten Zellzahlen durchführten; das ist für die vergleichende Betrachtung besonders wichtig. Zum Beispiel halten wir es nicht für angängig, wenn bei hämolytischen Testen zur Bestimmung der DHM α und β bzw. LH α von S 1%ige Zellsuspensionen von Kaninchen und Hammel miteinander verglichen werden. Eine 1%ige Suspension Kaninchenzellen enthält etwa $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml, eine entsprechende Hammelzellsuspension 10^8 Zellen/ml.

Die Einhaltung eines physiologischen p_H-Bereiches halten wir auf Grund unserer Erfahrungen bei Hämolyseversuchen für eine Voraussetzung. Wir wenden uns damit gegen die jüngst vorgelegten Ergebnisse von MANGALO und RAYNAUD, die für die S-Hämolyse ein Optimum von p_H 5,2 angeben. Diese Autoren übersehen Befunde, die von JACOBS und PARPART (1931), später von WILBRANDT (1941, 1944) bekannt wurden, wonach die osmotische Resistenz von Erythrozyten im sauren Milieu stark abnimmt, da infolge der p_H-Abhängigkeit des Hämoglobin-Basenbindungsvermögens der osmotische Druck im Inneren der Erythrozyten mit erhöhter Wasserstoffionenkonzentration zunimmt. MANGALO und RAYNAUD arbeiten unter diesen Bedingungen also primär schon an geschädigten Erythrozyten, die noch zusätzlich der Noxe des Toxins ausgesetzt werden. Dabei hatte RUD einige Jahre früher gezeigt, daß die S-Hämolyse unter einem p_H von 5,5 durch eine Spontanhämolyse stark beeinflußt wird. Diese Tatsache schränkt die von MANGALO und RAYNAUD erhobenen Befunde bedeutend ein.

Als wesentliches Ergebnis unserer Versuche möchten wir die Reihenfolge der Suszeptibilität der Zellen verschiedener Tierarten gegenüber der Hämolysefähigkeit von S bezeichnen. Katzenzellen sind weniger S-resistent als Rinder- und Hammelzellen; die geringste S-Empfindlichkeit zeigen die Erythrozyten von Ratten. Bei einem quantitativen Vergleich der Grenzkonzentrationen[5] waren Katzenzellen 12mal, Rinderzellen 18mal, Hammelzellen 29mal und Rattenzellen sogar 70mal weniger empfindlich auf das Toxin als Kaninchenzellen. In der zitierten Arbeit von SEIFFERT finden sich Angaben, die besagen, daß „Hammel- und Rinderblutkörperchen zur Lösung einer 10mal höheren Toxindosis als Kaninchenblut bedurften". Die Vergleichbarkeit dieser Angabe mit den von uns erhaltenen Befunden ist sehr relativ, da bei SEIFFERT Angaben über die Methodik fehlen. Die Reihenfolge in der Empfindlichkeit der roten Zellen der von uns untersuchten Tierarten entspricht der bisher bekannten hämolytischen Fähigkeit des α-Lysins, wenn man von den von uns erhobenen zusätzlichen Befunden an Katzen- und Rattenzellen absieht.

Die Hämolysegeschwindigkeit ist für die von uns untersuchten Zellarten verschieden. Diese ist am größten bei Kaninchenzellen, wesentlich geringer bei Katzen-, Rinder- und Hammelzellen. Am langsamsten verlieren die Rattenzellen unter der Einwirkung des Lysins ihren Farbstoff. Außerdem wird die Hämolyse durch die Zellkonzentration beeinflußt. Wir können damit MANGALO und RAYNAUD nicht bestätigen, die für Kaninchenzellen bei Veränderung der Zellzahl innerhalb einer Zehnerpotenz keine Veränderung der Hämolyse finden konnten. Auch für Katzen- und Rattenzellen ist der Einfluß der Zellzahl deutlich, während dieser bei Rinder und Hammelzellen fehlt. Dieser Befund würde den Angaben SEIFFERTS entgegenkommen, der im „Staphylokokkentoxin ein lipoidspezifisches Ferment" sieht. Dagegen spricht aber der für einen bestimmten S-Konzentrationsbereich völlig gleichartige Verlauf der Kurven aus den 50%-Hämolysewerten (Abb. 57) von Katzen-, Rinder- und Hammelzellen, deren Lipoidzusammensetzung starke Differenzen aufweist. Natürlich hängt die Hämolyse auch noch von anderen Faktoren ab, wie z. B. der Lysinkonzentration und auch der Temperatur. BERNHEIMER (1947) weist insbesondere auf diese Momente bei der Untersuchung verschiedener bakterieller Hämolysine. Seine Befunde, erhoben nur an Menschenerythrozyten, lassen keine Schlüsse in bezug auf die Hämolyse an Zellen anderer Spezies zu, wie wir zeigen konnten. Wenn wir versuchen würden, unsere Feststellungen einzuordnen in die von BERNHEIMER erhobenen Befunde, so wäre eine Proportionalität zwischen Hämolysegeschwindigkeit und Lysinkonzentration nur annähernd bei Rattenzellen gegeben.

Die Hämolyse durch S ist für alle von uns untersuchten Tierarten, wenn man von den Konzentrationsbereichen absieht, nicht unterschieden. Unabhängig von der Phospholipoidzusammensetzung der Zellmembran (TURNER, 1957; GANGULY, 1937) geht die „langsame" Hämolyse vor sich. Da die Hämolysegeschwindigkeit durch diese Faktoren nicht beeinflußt wird, scheint ein Hämolysemechanismus über Phospholipase A—Lysolecithin nicht in Frage zu kommen. FELDBERG und KELLAWAY haben an Stelle von Kobragift Staphylokokkentoxin auf Eigelb einwirken lassen und konnten keine Lysolecithinbildung finden. Dieser Befund entspricht unseren Ergebnissen. Gegen den Lysolecithinmechanismus spricht weiter, daß FORSSMANN durch Cholesterin die S-Hämolyse nicht beeinflussen konnte; denn Lysolecithin und Cholesterin verbinden sich zu einem hämolytisch unwirksamen Komplex (KAISER und MICHL, S. 173). Der hemmende Einfluß auf die Lysolecithinhämolyse ist indessen nicht auf das Cholesterin allein beschränkt, sondern ebenfalls leicht mit anderen Alkoholen und auch Fettsäuren möglich (JUNG, unveröffentlicht). Da nach GENGOU nach der Hämolyse mit S keine Zerstörung der Zellstruktur ge-

[5] d. h. nach 1000 min Hämolysedauer, da hier praktisch keine merkliche Hämolyse mehr stattfindet.

funden wird im Gegensatz zur Lysolecithinhämolyse (Habermann u. Mölbert, 1954) ist im Zusammenhang mit dem negativen chromatographischen Nachweis von Phospholipaseaktivität eine Phospholipasewirkung nicht anzunehmen. Damit scheint also eine hämolytische Wirkung von S über die Phospholipoide der Membran der roten Zellen (Forssmann, Seiffert, Levine, Rud) durch unsere vergleichenden Untersuchungen an Zellen verschiedener Spezies nun endgültig überholt. Damit unterscheidet sich die S-Hämolyse wesentlich von der Streptolysinhämolyse, die Howard, Wallace (1953) und Payling Wright (1953) mit Cholesterin, Ergosterin u. a. in vitro antagonisieren konnten.

Bemerkenswert erscheint uns die hemmende Wirkung des Hämoglobins auf die S-Hämolyse. Die Zugabe von Hämoglobinlösung zu verschiedenen Lysinverdünnungen führt zu einer erheblichen Abnahme der hämolytischen Wirksamkeit und einer Hämolyseverzögerung. Höhere S-Konzentrationen werden stärker gehemmt als niedere. Da das noch hämolysierende S eine weitere Einschränkung seiner hämolytischen Potenz durch das während des Hämolyseprozesses freiwerdende Hämoglobin erfährt, ist wahrscheinlich, daß das Hämoglobin mit dem Toxin reagiert. Da höhere S-Konzentrationen stärker hämolysieren, d. h. mehr Hämoglobin freisetzen als geringe S-Konzentrationen, wirkt sich die Hemmung der S-Hämolyse bei den höheren S-Konzentrationen mehr aus als bei den niederen. Hämoglobin als basische Substanz verbindet sich, wie wir vermuten, mit irgendwelchen sauren Gruppen des S-Moleküls, damit wird es unwirksam und verliert seine hämolytische Fähigkeit. Die Auseinandersetzung zwischen Toxin und Hämoglobin kann dabei als chemische Reaktion oder eine assoziative Anlagerung aufgefaßt werden. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß Hobson und Hirsch (1957) eine antibakterielle Wirkung von Hämoglobin gegenüber gram-negativen Bakterien beschrieben haben. Diese Wirkung ist an die Proteinkomponente gebunden, da natives wie auch durch Säuren denaturiertes Hämoglobin die antibakterielle Aktivität behält. Durch Polysaccharide, wie z. B. Heparin, ließ sich diese Fähigkeit des Proteins reduzieren. Ein ähnlicher Mechanismus bei der Reaktion Toxin/Hämoglobin erscheint diskutabel.

Unsere Versuche mit Glukosezusatz führten zu einer Veränderung des Hämolyseablaufs. Die Hämolyse war in der hypertonen (durch Glukose) Lysinverdünnung geringer als in der Lysinkonzentration ohne Glukose. Nach über einer Stunde Hämolysedauer stellte sich aber bei der hypertonen Lysinkonzentration derselbe Endwert wie in den Kontrollen ein. Damit scheint die Auseinandersetzung Lysin/Zelle praktisch von osmotischen Bedingungen unabhängig. Da wir in schwach hypertonem Milieu arbeiteten, bekamen wir nur eine partielle Hämolysehemmung. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Rigdon und auch Ponder überein, die in stark hypertonem Milieu eine völlige Hemmung ihrer Lysinzellsysteme erhielten. Bernheimer konnte durch Zusatz von Glukose die hämolytische Wirkung von Clostridium septicum teilweise unterdrücken. Damit scheint auch diese bakterielle Hämolyse vom osmotischen Druck unabhängig zu sein.

Einige Hämolyseversuche hatten wir mit S lyo. unternommen. Damit sind wir in der Lage, einige Angaben quantitativer Art zur Hämolyse zu machen. Entsprechend der hämolytischen Aktivität von S lyo. an Kaninchenzellen errechnet sich für S_{II} eine Konzentration von 16,5 mg S lyo./ml Filtrat (15. 2.) und 16,6 ml S lyo./ml Filtrat (17. 2.). Diese Mengen- bzw. Aktivitätsangaben stimmen gut überein mit den bei den Letalitätsversuchen errechneten Mengen (siehe unten). Außerdem wird deutlich, daß S lyo. bezüglich seiner hämolytischen Fähigkeit an Kaninchenzellen sich nahezu doppelt so wirksam wie S_{II} zeigte. Der Konzentrationsbereich, in dem Kaninchenzellen hämolysieren, läßt sich nun mit annähernd 10^{-5} bis $2 \cdot 10^{-8}$ g/ml angeben. Das α-Lysin des Staphylokokkentoxins stellt ein hochwirksames Hämolytikum dar, dessen Aktivität der der bekannten aktiven Lysine, wie Na-dodecylsulfat, Saponin u. a., nicht nachsteht.

Die von uns neu aufgestellte Hämolysereihe läßt sich weder mit der Zellgröße, noch mit der Zelloberfläche oder dem Cholesteringehalt der Membranen (Jung, 1949) in Zusammenhang bringen. Auch der unterschiedliche Lipoidgehalt der Zelle spielt für die S-Hämolyse keine Rolle. Lediglich die Auseinandersetzung zwischen Lysin und Eiweißkörper läßt einen proteolytischen Prozeß möglich erscheinen.

4. Das α-Lysin des Staphylokokkentoxins ist vornehmlich letal für Mäuse, im Gegensatz zum β- und γ-Lysin, die für Mäuse nicht tödlich wirken. Dworetzky und Mitarbeiter, die ihre Untersuchungen wie wir mit einem Toxin von Wood 46 durchführten, fanden letale Wirksamkeit gegenüber Kaninchen und auch Meerschweinchen nur mit Filtraten, dagegen nicht mit Extrakten. Kaninchen reagierten wesentlich heftiger und empfindlicher auf das α-Lysin als Meerschweinchen. Auf 100 °C erhitztes Filtrat war wirkungslos. Unsere Ergebnisse bezüglich der Allgemeintoxizität sind mit denen von Dworetzky und Mitarbeitern quantitativ nicht vergleichbar, da sie eine Art von LD_{100}, die sie als MLD bezeichnen, in mg Protein/Stickstoff bestimmten. Dagegen entsprechen qualitativ im Hinblick auf die Vergiftungsbilder unsere Beobachtungen den ihren. Das pathologische Verhalten der Tiere nach der Intoxikation möchten wir dahingehend deuten, daß zentrale Angriffspunkte nicht auszuschließen sind. „Neurotrope" Wirkungen von Staphylokokkentoxin wurden schon früher von Burky (zit. n. Schmidt, 1940) erwähnt. Das Verhalten von Katzen nach intraventrikulärer Gabe von S (Raškova u. Vaneček, 1958; Wiegershausen, unveröffentlicht) würde sich hier ebenfalls gut einfügen. Eine Histaminwirkung für den letalen Faktor verantwortlich zu machen, glaubt Dolmann (1932) ausgeschlossen zu haben. Für das Serotonin ist sicher das gleiche anzunehmen, auch aus dem Grunde, da das für letale Wirkungen erforderliche Serotonin oder auch Histamin nicht einmal in genügender Menge im Gewebe vorhanden ist. Der Histaminspiegel des Körpergewebes wird mit 8—10 μg/g angegeben (Sjoerdsma, Waakles u. Weisbach, 1957; Mayer u. Brousseau, 1946), der Serotoninspiegel mit 0,8—2 μg/g Maus (Udenfriend, Weisbach u. Brodie, 1958), während die i. v. LD_{50} an Mäusen 166 μg/g Histamin und 137 μg/g Serotonin beträgt (Higginbotham, 1959). Es ist jedoch bekannt,

daß Mäuse von verschiedenen Stämmen sehr unterschiedlich auf Histamin reagieren. Die Größe der LD_{50} von Histamin kann, wie LANE PETTER (1959) berichtet, sich um den Faktor 50 bei den einzelnen Stämmen unterscheiden. Wir nehmen aber doch an, daß im pathologischen Geschehen dem Serotonin bzw. Histamin Bedeutung zukommen, indem sie zum Bild der Intoxikation beitragen.

Die unterschiedliche letale Aktivität der von uns benutzten Staphylolysinchargen gleicher Herkunft (Wood 46) hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dabei messen wir u. a. den Einflüssen, die das Toxin direkt verändern, wie Alterung und Lagerung, Bedeutung bei. Es ist eine längst bekannte Erfahrung, daß lyophilisierte Präparate in ihrer Haltbarkeit, d. h. in ihrer letalen Aktivität und ihren anderen Eigenschaften, nahezu uneingeschränkt sind. Für uns waren die Versuche zur Bestimmung der letalen Wirkung des lyophilisierten Toxins von Wichtigkeit, da diese uns einige quantitative Aussagen bezüglich der angewandten Mengen des Toxins in g/kg bzw. μg/g gestatten.

Wir errechneten bei Bestimmung der LD_{50} am 19. 11. mit S lyo. an weiblichen Mäusen (KONAROVICE) $5{,}31 \cdot 10^{-5}$ ml/g Maus. Das entspricht 1,48 μg/g Maus an lyophilisiertem Staphylolysin. Am 21. 1. wurde die LD_{50} mit 1,77 μg/g Maus (BIOVETA) errechnet. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von BUTLER (1959), der mit lyophilisiertem α-Toxin von Wood 46 bei Mäusen eine LD_{50} von 2,5 μg/g Maus erhielt.

Unter der Voraussetzung, daß gleiches Tiermaterial auf Staphylokokkentoxin unter gleichen Bedingungen (Tierzucht, Futter, Gewicht, Alter, Geschlecht, Tageszeit usw.) gleich empfindlich ist, können wir annehmen, daß die Mäuse bei entsprechend gleichen Konzentrationen von S reagieren unabhängig davon, ob es sich um ein Filtrat des α-Toxins oder ein lyophilisiertes Produkt handelt. Die Werte für die LD_{50} des Filtrats und des lyophilisierten Toxins können wir damit als übereinstimmend ansehen. Entsprechend kann die Konzentration der Filtrate in mg S lyo./angegeben werden. Diese betrug am:

19. 11. 1959	19,7 mg/ml Filtrat
21. 1. 1960	15,5 mg/ml Filtrat.

Die von uns errechneten S-Konzentrationen der Filtrate für die Hämolyseversuche (siehe oben) mit 16,5 bzw. 16,6 mg/ml (am 15. und 17. 2. 1960) stimmen gut mit diesen Mengen überein und besagen, daß das von uns benutzte Filtrat (S_{II}) über einen Zeitraum von mehreren Monaten konstante Mengen aktives S enthielt.

Der Einfluß des Alters auf die letale Wirkung von Toxinen ist ein sehr interessantes Problem, insbesondere darum, weil bei vielen pathophysiologischen Zuständen, die durch Bakterientoxine hervorgerufen werden, das Alter eine Rolle spielt. BURKY fand, daß junge Kaninchen auf Staphylokokkentoxin erst im Alter von 4 Monaten reagieren. Bei neugeborenen Ratten nimmt die Empfindlichkeit auf den letalen Faktor von Staphylokokkentoxin bis zum 18. Lebenstag zu und ändert sich dann nicht mehr, wie 1955 JOHANOVSKY beobachtete. Eine Abnahme der Empfindlichkeit bis zum 8. Tag nach Geburt konnte mit Salmonella-Endotoxin (GUYON, POYER u. CHEDID, 1952) und mit Tetanustoxin (YENIKEYEVA u. ROZANOVA, 1954) bei Ratten festgestellt werden. Ausgedehnte Untersuchungen über Letalitäts-Alters-Beziehungen sind von RAŠKOVA u. SPIČAK (1957) mit Shigella Shigae-Toxin an Ratten durchgeführt worden, die wiederum zeigen, daß die Suszeptibilität in den ersten Wochen nach der Geburt vom Alter abhängig sich verändern kann. Unser negatives Ergebnis mit S an jungen und älteren Mäusen besagt lediglich, daß bei Mäusen, die über 20 Tage alt sind (12,2 g), die Empfindlichkeit auf den letalen Faktor konstant bleibt. Inwieweit die Befunde von JOHANOVSKY an Ratten auch für Mäuse gelten können, ist einstweilen nicht zu entscheiden.

Über geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit auf bakterielle Toxine ist bisher nichts bekannt. Wir haben kürzlich (RAŠKOVA u. WIEGERSHAUSEN, 1960) berichten können, daß männliche Mäuse signifikant empfindlicher auf S reagieren als weibliche Mäuse (siehe Tabelle 4). Die Resistenz der weiblichen Tiere zu diesem Toxin ist also ausgesprochen höher.

Bei Durchsicht der Literatur der beiden letzten Jahre zur Frage der Geschlechtsspezifität fanden wir, daß weibliche Ratten gegen bestimmte Stoffe resistenter sind als männliche Tiere. Die Toleranz zum Morphin ist bei weiblichen Ratten größer als bei männlichen (ANGELUCCI, 1958), auch Chlorpromazin wird von weiblichen Tieren besser toleriert als von männlichen, deren Toleranz mit zunehmendem Alter sogar noch reduziert wird (HOFFMANN u. ZARROW, 1958). Auch WALLGREEN (1959) konnte bei weiblichen Ratten in Abhängigkeit vom Alter eine höhere Alkoholtoleranz gegenüber Männchen konstatieren. SILBERGELD u. CARTER (1959) finden bei Verfütterung von Glykolsäure (1—2% im Futter) Wachstumsabnahme, Oxalatbildung in der Niere u. a. bei männlichen Ratten, nicht dagegen bei weiblichen. Adrenalektomierte weibliche Ratten überleben länger als männliche, wie kürzlich wieder KUSCH und KIRCHNER (1959) angeben. Der Einfluß hormoneller Faktoren bei der Reaktion auf Drogen konnte in eindrucksvoller Weise von AXELROD (1960) gezeigt werden.

Unsere Versuche sollen auf die Bedeutung geschlechtsspezifischer Momente in der Reaktion auf Toxine hinweisen und anregen, diesen Faktoren mehr als bisher Beachtung zu schenken.

Bemerkenswert erscheint uns die Tatsache, daß in unseren Versuchen (siehe Abb. 52 u. 54) die Mäuse der Farm KONAROVICE auf den letalen Faktor von S empfindlicher reagieren als die Mäuse von der BIOVETA-Farm. Bei diesen fand sich auch eine größere Streuung. Trotz der verschiedenen Empfindlichkeit waren die Differenzen in jedem Falle gut sichtbar und zu reproduzieren.

Bei der vergleichenden Prüfung der letalen Wirkung an Mäusen und Ratten fanden wir die letzten nahezu doppelt so empfindlich wie Mäuse. Nach D'ANTONA sollen Kaninchen auf $^1/_{20}$ der bei Mäusen letal wirkenden Dosen sterben, während Meerschweinchen bei $^1/_3$ der für Mäuse tödlichen Dosen überhaupt noch nicht reagieren. Bei entsprechen-

der Berechnung der von D'ANTONA gemachten Angaben ergibt der Vergleich mit unseren Ergebnissen (letale Dosen in mg/kg Tier):

Tabelle 4

Spezies	♀♂	Dosis mg/kg	Appl.	Wirkung	Bemerkung
Kaninchen	?	0,09	i.v.	letal	D'ANTONA
Meerschweinchen	♀	0,2	i.c.	letal	21. 1. 60
Meerschweinchen	?	0,6	i.v.	ohne	D'ANTONA
Ratte	♀	1,05	i.v.	letal	21. 1. 60
Maus	♂	1,33	i.v.	letal	21. 1. 60
Maus	♀	1,77	i.v.	letal	21. 1. 60

Die Differenz zu D'ANTONA, der das Meerschweinchen relativ wenig ansprechbar auf den letalen Faktor von S fand, ist u. E. weniger in der verschiedenen Applikationsweise zu suchen als vielmehr in rassen- und zuchtspezifischen Eigenarten der benutzten Tiere. Die Empfindlichkeit der einzelnen Spezies auf das von uns benutzte Staphylokokkentoxin nimmt in der Reihenfolge ab: Kaninchen (Meerschweinchen), Ratte, Maus.

VI. Schlußbetrachtung

1. Staphylokokkentoxin ist kein einheitlicher Körper (v. HEYNINGEN), sondern, wie schon hervorgehoben, ein Produkt, das aus einer Reihe von Stoffen mit verschiedenen Wirkungen besteht. Bestimmte Anteile des Toxins können unter geeigneten Bedingungen von den Bakterien vermehrt gebildet werden, wobei andere Komponenten wenig oder überhaupt nicht produziert werden. Das von uns benutzte Toxin ist unter solchen Bedingungen hergestellt worden, daß es fast ausschließlich bzw. in überwiegendem Maße eine bestimmte Komponente enthielt. Das Vorkommen dieses Anteils in den verschiedenen von uns untersuchten Chargen Staphylolysin im Hinblick auf übereinstimmende reproduzierbare pharmakologische, letale und auch hämolytische Wirkungen läßt vermuten, daß wir unsere Versuche mit einem relativ einheitlichen Material durchführten. Diese Bemerkungen erlauben jedoch keinesfalls den Schluß, daß es sich damit auch um einen oder mehrere chemisch definierte Körper handelt. Indessen möchten wir bemerken, daß wir mit unserem Toxin im Verlauf eines halben Jahres und mehr unter geeigneten Lagerungsbedingungen gleiche Aktivitäten in bezug auf pharmakologische, letale und hämolytische Wirkungen feststellen konnten.

Durch welche Eigenschaften ist das von uns benutzte Toxin nun charakterisiert, und welcher Komponente des Toxins entsprechen seine Fähigkeiten?

a) Das von uns benutzte Filtrat war für Mäuse und andere Tiere letal. Diese Fähigkeit kommt nur dem α-Lysin des Staphylokokkentoxins zu, nicht dem β- und γ-Lysin, die zwar wie das α-Lysin Kaninchen, nicht aber Mäuse töten können.

b) Das von uns benutzte Filtrat hämolysierte in hoher Verdünnung Kaninchenerythrozyten. Diese Eigenschaft und damit verbunden die Reihenfolge der Suszeptibilität der Zellen anderer Spezies (Kaninchen, Rind, Hammel) weisen auf Wirkungen des α-Lysins hin.

c) Das von uns benutzte Filtrat war äußerst thermolabil. Erhitzen auf 100 °C für 3 min führte zum vollständigen Verlust pharmakologischer Aktivität. Das γ-Lysin ist ebenfalls sehr hitzeempfindlich, zeigt aber keine pharmakologische Aktivität am Kaninchendarm (ANDERSON, JAMES und MARKS). Partiell hitzelabil sind das β-Lysin, das eine andere hämolytische und pharmakologische Aktivität zeigt, und das δ-Lysin, das nur Hammelerythrozyten lysiert. Entsprechend können wir in unserem Filtrat α-Lysin annehmen.

Das zu erwähnen geschieht darum, um eine deutliche Abgrenzung gegen Enterotoxin vornehmen zu können. Enterotoxin kann neben dem α-Lysin bei Nahrungsmittelvergiftungen eine große Rolle spielen. Da Enterotoxin in hohem Grade hitzeresistent ist, wird es im Gegensatz zu α-Lysin durch Kochen und Braten nicht zerstört (Literatur bei BORBELY, 1959). Aufgekochte Filtrate bringen insbesondere das Ratten-Duodenum, das für S wenig empfindlich ist, zur Kontraktion (SEDLAK und PRŮCHOVA). Diese Wirkung ist reversibel, auswaschbar, atropin- und antihistaminfest. Am Meerschweinchen-Ileum zeigt Enterotoxin nur eine Tonuszunahme, am Kaninchendarm eine Tonuserhöhung mit Zunahme der Motilität, wie schon aus den Befunden von RICHMOND, REED u. a. hervorgegangen ist. Da wir an diesen Organen mit S andere Wirkungen beobachteten, kann angenommen werden, daß unser Filtrat kein Enterotoxin enthielt.

d) Das von uns benutzte Filtrat war ausschließlich vom Stamm Wood 46 gewonnen, einem menschenpathogenen Staphylokokkenstamm, der insbesondere für die Bildung von α-Lysin benutzt wird (SCHMIDT, D'ANTONA). S entspricht also dem Lysin, an dem WITTLER und PILLEMER sowie BUTLER, aber auch MANGALO und RAYNAUD ihre Untersuchungen durchgeführt haben.

Diese Tatsachen weisen darauf hin, daß das uns zur Verfügung gestellte Staphylokokkentoxin vornehmlich α-Lysin enthielt. Das α-Lysin ist das am längsten bekannte und das wichtigste der Staphylokokkentoxine (v. HEYNINGEN, D'ANTONA). Unsere Untersuchungen erstreckten sich also auf das Haupttoxin des Staphylokokkengiftes. Über die Art der Wirkung dieses Toxins ist bisher nichts bekannt, wie v. HEYNINGEN noch 1950 schreibt.

2. Schon einleitend konnten wir anführen, daß trotz der geringen Kenntnis über die chemische Struktur das allgemeine Verhalten von S vermuten lasse, daß es zur Gruppe der Proteine gehöre. Seine hohe Giftigkeit, seine Thermolabilität, seine Antigenität, sein hohes spezifisches Reaktionsvermögen stellen Faktoren dar, die, wie wir noch anführen werden, den Proteincharakter unterstreichen. Nun weiß man schon lange, daß hämolytisch stark wirkende Gifte nicht nur Blutzellen, sondern auch andere Körperzellen angreifen können. Die Kenntnis der Bedingungen, die zur Hämolyse führen, kann beitragen zur Kenntnis über die Art der Wirkung von Toxinen allgemein (BERNHEIMER). S wird von D'ANTONA als „zytolytisches Toxin" bezeichnet, da es nicht nur Erythrozyten, sondern auch andere Zellen löst. In diesem Sinne kann die dermonekrotische Aktivität des α-Lysins aufgefaßt werden,

aber auch die Freisetzung von Substanzen aus den Lungen (Feldberg und Mitarbeiter) und aus dem Uterus und anderen Organen. Diese Lyse fermentativ eventuell als Proteolyse aufzufassen, wurde von uns in bezug auf hämolytische Mechanismen diskutiert. Quevauviller und Mainil (1949) beschrieben biphasische Reaktionen am peripheren Froschnerven mit Staphylokokkentoxin. Da diese Autoren mit Trypsin analoge Befunde erhielten, halten sie S für ein proteolytisches Enzym. Trypsin ist ein hitzelabiler Körper, dessen LD_{50} an der weißen Maus (Rocha e Silva, 1940) dem von S entspricht. Die pharmakologischen Eigenschaften von Trypsin haben nicht nur große Ähnlichkeit mit den Wirkungen von Schlangengiften (Rocha e Silva, 1955), sondern unseres Erachtens auch mit den Wirkungen des α-Lysins. Trypsin und Schlangengift (z. B. von Bothrops jajaraca) bedingen am Ileum des Meerschweinchens eine langsam sich verstärkende Tonisierung mit nachfolgender Unempfindlichkeit oder auch Tachyphylaxie. Diese pharmakologische Wirkung steht in enger Beziehung zu ihren enzymatischen Eigenschaften, nämlich bestimmte Peptidbindungen zu lösen und damit Substanzen oder Bestandteile, die normalerweise an Plasma oder Zellprotein gebunden sind, freizusetzen. Da Schlangengift, Staphylokokkentoxin (Feldberg und Mitarbeiter) und Trypsin (Rocha e Silva) bei Durchströmung von Lungen und Leber verschiedener Spezies Histamin freisetzen, wurde für das Histamin eine Mittlerrolle bei diesen Wirkungen vermutet. Auch über Phospholipase A—Lysolecithin kann es, wie erwähnt, zur Freisetzung von Histamin kommen. Da nach unseren Befunden der Lysolecithinmechanismus für die Hämolyse auszuschließen ist, dürfte dieser für den pharmakologischen Wirkungsmechanismus ebenfalls keine Rolle spielen. Damit kann für die muskulärangreifende Substanz eine „Slow reacting substance" im Sinne von Feldberg und Kellaway, Gabr und Vogt (Fettsäurecharakter) nicht in Frage kommen.

Proteolytische Fermente legen Substanzen von Polypeptidstruktur frei, die insbesondere die glatte Muskulatur stimulieren. So kann Schlangengift oder Trypsin aus Serum Bradykinin freisetzen (Rocha e Silva, Beraldo und Rosenfeld, 1949). Kallikrein (Frey und Kraut, 1928), ein Ferment, das aus Pankreas, Speicheldrüsen oder Urin gewonnen wird, führt zum Auftreten von Kallidin (Werle u. a., 1950). Dieser Körper ist wahrscheinlich mit dem Bradykinin identisch, nicht jedoch in dem Bradykinin-freilegenden Prinzip (Werle, 1950). Aus der elektrophoretisch als α_2-Globulin charakterisierten Eiweißfraktion des Blutserums entstehen durch verschiedene Fermente mindestens 6 auf die glatte Muskulatur wirkende Polypeptide (Tuppy, 1956). Die Anzahl physiologisch aktiver Polypeptide hat sich in der letzten Zeit um mehrere Substanzen noch erweitert, so daß eine weitere Aufzählung sich erübrigt. Wesentliches Merkmal all dieser Stoffe ist allgemein die Wirkung auf die glatte Muskulatur.

Diese Bemerkungen in Zusammenhang mit den von uns und anderen Untersuchern beobachteten Wirkungen von S zu bringen, ist naheliegend. Wir stellen uns vor, daß S auf Grund seiner potentiell proteolytischen Eigenschaften in der Lage ist, aus bestimmten Eiweißkörpern der Zelle polypeptidähnliche Körper fermentativ freizulegen und diese auf Grund seiner permeabilitätsfördernden Eigenschaften, wobei die hämolytische Wirkung nur einen Sonderfall darstellt, aus der Zelle bzw. dem Zellverband freizusetzen. Es ist indessen auch denkbar, daß die Permeabilitätsförderung direkt durch die Polypeptide zustande kommt, wie Schachter und Mitarbeiter (1960) u. a. für ein hoch gereinigtes Bradykinin deutlich machen konnten.

Mit diesen Vorstellungen erlauben wir uns einige Bemerkungen zum Wirkungsmechanismus von S.

3. Keine der von uns mit S beobachteten Reaktionen ließ eine Latenzzeit vermissen. Die Ursache der langsamen Entwicklung der S-Wirkung kann darin liegen, daß das große S-Molekül langsam zu den Rezeptoren bzw. den kontraktilen Elementen des Darmes, des Uterus usw. diffundiert, zu denen kleinere Moleküle wie Histamin, Serotonin oder Acetylcholin rasch gelangen. Mit dieser Feststellung läßt sich aber die spezifische Serotoninwirkung, die nur durch Freisetzungsmechanismen vorstellbar ist, nicht vereinbaren, und damit rückt ein Wirkungsmechanismus über fermentative Prozesse mehr in den Vordergrund. Wir vermuten, daß S auf Grund seiner Fermentnatur in Anwesenheit eines geeigneten Substrats aus den Organen ein pharmakodynamisch aktives Prinzip, ähnlich einer „Slow reacting Substance" von Polypeptidstruktur freisetzt. Die Wirkungen dieses Körpers können am Meerschweinchen-Ileum und Kaninchen-Jejunum mit Papaverin antagonisiert werden (Quilliam und Mitarbeiter). Am Uterus der Ratte kann Adrenalin, wie erwähnt, der Tonisierung entgegenwirken. Da Papaverin und auch Adrenalin muskulotrope Angriffspunkte haben, können wir annehmen, daß die tonisierende Wirkung durch die rein muskelangreifende freigesetzte Substanz geschieht. Dieser Freisetzung geht eine Serotoninfreisetzung voraus. Kleine Dosen von S setzen zunächst nur serotoninähnliche Körper frei, z. B. am Uterus der Ratte, der bei geringen Konzentrationen Serotonin seine spontanen Kontraktionen verstärkt, oder am Meerschweinchen-Ileum, dessen Längsmuskulatur durch Einwirkung von Serotonin auf cholinergische Mechanismen, die atropinempfindlich und nicht LSD-hemmbar sind, erregt wird. Das Auftreten eines serotoninähnlichen Körpers kann allein schon durch die permeabilitätssteigernden Fähigkeiten von S erklärt werden. Größere Dosen S werden dann weiter fermentativ andere Bestandteile der Zelle freisetzen, die stark myoaktiv sind (Tonuserhöhung). Hält dieser Prozeß in Anwesenheit großer S-Konzentrationen in stärkerem Maße an, so kommt es zur Schädigung der Zelle bzw. des Zellverbandes (Spasmus und maximale Kontraktur) und zum Verlust der Ansprechbarkeit des Organs auf Pharmaka. Die Freisetzung myoaktiver Körper ist nicht bei allen Organen gleich; z. B. konnten wir am Meerschweinchen-Ileum nach S die motilitätserhöhende Wirkung (Serotonin) regelmäßig, die Tonisierung dagegen nicht immer beobachten. Verstärkte Tonisierung stand immer mit einer Herabsetzung der Empfindlichkeit in Korrelation. Die Abnahme der Empfindlichkeit war abhängig von der Dauer der maximalen Kontraktur. Wurde nach Erreichen der maximalen Kontraktur gleich gespült und künstlich (mit Gewicht) das Organ relaxiert, war ein

Reagieren auf S und Pharmaka zumindest in abgeschwächter Form immer zu beobachten.

Die partielle bzw. totale Abnahme der Empfindlichkeit ist auch zu beobachten bei Anwendung von Antagonisten. Am Uterus der Ratte finden wir mit Serotoninantagonisten, am Meerschweinchen-Ileum und Kaninchen-Jejunum Quilliam und Mitarbeiter mit Papaverin trotz völliger Unterdrückung der S-Reaktion die Empfindlichkeit auf Pharmaka eingeschränkt bzw. aufgehoben. Die Antagonisten sind in der Lage, die Wirkungen des myoaktiven Prinzips, Serotonin und „Polypeptid" zu blockieren, nicht jedoch ihre Bildung bzw. Freisetzung aus der Zelle durch S zu verhindern. Damit wird deutlich, daß mit den von Quilliam und uns angewandten Antagonisten nicht die Ursache der S-Wirkung, sondern nur ihr Folgezustand unterdrückt wird.

Quilliam und Mitarbeiter halten einen direkten muskelstimulierenden Mechanismus bei der S-Wirkung für wahrscheinlich. Am Meerschweinchen-Ileum konnten diese Autoren eine Histaminfreisetzung ausschließen, in gleicher Weise sprechen unsere Versuche am histaminunempfindlichen Ratten-Uterus. Die Möglichkeit eines Einflusses von freigesetztem Serotonin am Meerschweinchen-Ileum durch S wird von Quilliam und Mitarbeitern nicht in Betracht gezogen, obgleich ihre Versuche für diesen Mechanismus sogar Hinweise geben (partielle Hemmung mit Neoantergan). Wenn diese Autoren Atropin am Meerschweinchen-Ileum ohne Einfluß auf die S-Reaktion fanden, so liegt das an dem zu hohen Konzentrationsbereich von S, den sie anwenden. Die tonisierende Wirkung der „contracture-producing substance" überdeckt nämlich die „cholinergische" Wirkung des Serotonins. Die Hemmung der S-Kontraktur durch Papaverin (Quilliam) im Zusammenhang mit der Freisetzung von Serotonin (Wiegershausen) macht das Auftreten bzw. Freiwerden eines myoaktiven Körpers nach einer Latenzzeit sehr wahrscheinlich. Damit ist aber eine direkte muskelstimulierende Wirkung im Sinne von Brown, Prichard und Quilliam — wie wir es früher auch angenommen haben (Wiegershausen, 1959 d) — unwahrscheinlich. Quilliam unterscheidet bei der S-Reaktion eine „stimulierende" und eine „toxische" Komponente, die voneinander nicht zu trennen sind. Bei niederen S-Konzentrationen lassen sich, wie gezeigt wurde, diese Komponenten sehr gut differenzieren.

Auch die Versuche von Raškova, Vaneček und Čapek (1957), die mit Streptolysin 0 am Ratten-Uterus einen bradykininartigen Effekt beobachtet haben, konnten in weiteren Versuchen auf die Freisetzung von Substanzen durch dieses Toxin hinweisen (Waitzova, Sobek und Raškova, 1959).

Wir können zusammenfassen: Das α-Lysin des Staphylokokkentoxins entfaltet pharmakologische Effekte an isolierten Organen auf direktem wahrscheinlich enzymatischem Wege. Dabei kommt es wohl zunächst auf Grund seiner permeabilitätssteigernden Fähigkeit zu einer Freisetzung von Serotonin. Im Verlauf weiterer Einwirkung führt S, ähnlich wie Trypsin, zur Freilegung und Freisetzung muskelstimulierender Körper aus den Bestandteilen der Zelle. Die S-Wirkung an glattmuskulären Organen ist also durch das Auftreten von zwei Stoffen als myoaktives Prinzip charakterisiert. Das Verhältnis dieser beiden stimulierenden Körper zueinander kann von Organ zu Organ wechseln. Während das Serotonin kontraktionsauslösend durch den neuronal-cholinergischen und auch direkt muskulären Mechanismus wirkt, führt der andere muskelstimulierende Körper zur Kontraktur. Diese Vorstellungen lassen es möglich erscheinen, den pharmakologischen und den hämolytischen Wirkungsmechanismus auf die gleichen Ursachen zurückzuführen.

4. Um eine vergleichende Betrachtung der verschiedenen Eigenschaften von Staphylokokkentoxin war man schon immer bemüht. Am meisten wurden die hämolytische, letale, dermonekrotische Aktivität miteinander verglichen und ihre Beziehung zueinander untersucht.

Burnet (1929) stellte bei Umwandlung des Toxins in Toxoid den völligen Verlust letaler, dagegen nicht hämolytischer Aktivität fest. Wie bereits Parker (1924), so nimmt auch später Burky (1933) an, daß das Hämolysin nicht direkt mit der Bildung des letalen Faktors verbunden ist. Während bei Lagerung des Toxins die hämolytische Aktivität abnimmt, bleibt die letale erhalten (Literatur bei Schmidt). Mit Lithium-Chlorid konnten Avery und Mitarbeiter (1937) die dermonekrotischen Eigenschaften des Toxins verhindern, während die Hämolyse unbeeinflußt blieb. d'Antona (1958) wies an Hand eines großen Materials darauf hin, daß letale, hämolytische und dermonekrotische Aktivität sich gleichermaßen verhalten. Ein Staphylokokkentoxin (α-Lysin), das stark letal wirksam ist, zeigt nach d'Antona starke hämolytische und dermonekrotische Effektivität und umgekehrt. Mehrere aktive Faktoren im α-Lysin nimmt Butler (1959) an, der eine unterschiedliche Denaturierung des hämolytischen und letalen Faktors demonstrierte. Ob Hämolyse und letale Wirkung an gleiche oder verschiedene Toxinfraktionen gebunden ist, bleibt nach wie vor eine offene Frage. In diesem Sinne hält auch Quilliam die hämolytische und „darmstimulierende" Aktivität für Eigenschaften verschiedener Prinzipien.

Wenn wir diese Betrachtungsweise auch bei dem von uns benutzten Toxin anwenden und vielleicht noch einen neuen Wirkungsparameter, den pharmakologischen, hinzufügen, so sind wir uns über den Wert eines derartigen Vorgehens klar. Solange ein Toxin noch nicht chemisch, jedoch biologisch durch seine Antikörper definiert ist, wird man bestrebt sein, das Toxin durch seine verschiedenen Wirkungsparameter zu charakterisieren. Die Relationen der einzelnen Parameter zueinander lassen sich für S gut zeigen und reproduzieren. Wenn wir die stärkste Aktivität immer gleich 1 setzen, erhalten wir folgende Übersicht:

Tabelle 5. Vergleich der pharmakologischen (Ratten-Uterus), letalen (LD_{50} an der Maus) und hämolytischen (Kaninchenzellen) Aktivität von Staphylolysin

	S_{II} (6,5 Monate alt)			
Aktivität	S lyo.	−10	+2	+20 °C (Lagerungstemperatur)
pharmakologische	1	: 1,5	: 3	: > 12,0
letale	1	: 2,7	: 9,1	: 35,5
hämolytische	1	: 1,8	: 11,0	: 26,6

Tabelle 6. Vergleich der pharmakologischen, letalen und hämolytischen Aktivität von S_{II} (6,5 Monate alt)

Aktivität	−10	+2	+20 °C (Lagerungstemperatur)	
pharmakologische	1 : 2	: > 8		
letale	1 : 4	: 12		
hämolytische	1 : 6,4	: 15		
DHMα	1 : 4	: 16		Titration im Institut für Sera und Vakzine, Prag

Neben den bereits erhobenen Befunden finden wir bei Vergleich der einzelnen Wirkungsparameter: Hohe Letalität entspricht hoher hämolytischer und pharmakologischer Aktivität. Diese von uns durchgeführten Vergleiche gelten nur für die untersuchten Chargen Staphylolysin und sind nicht unbedingt zu verallgemeinern. Raškova und Mitarbeiter (1956) fanden derartige Beziehungen bei Streptolysin 0 nicht, vielmehr betonen sie, daß Letalität und Hämolyse voneinander unabhängige Größen sind. Interessant erscheint uns ein möglicher Zusammenhang zwischen der hämolytischen und cardioaktiven Wirkung von S, wie von anderen Stoffen längst bekannt ist, z. B. vom Streptolysin 0, Saponin, Lysolecithin, von den Gallensäuren u. a.

5. Der Vergleich der verschiedenen Eigenschaften bzw. der Wirkungsparameter des Toxins geschieht auch darum, um gewisse Beziehungen zwischen diesen und dem pathophysiologischen Bild der Erkrankung zu finden. Zwischen der Schwere des Krankheitsbildes bei Staphylokokkeninfektion und der Fähigkeit der Staphylokokken zur Hämolyse und Nekrose ließen sich jedoch von Nelis (1934), Bonnet und Thieffry (1935) keine Relationen aufstellen.

Unsere Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß aus isolierten Organen auch andere Substanzen als Histamin freigesetzt werden. Allgemein konnte Fink (1956) darauf schon hinweisen, indem er betonte, daß Antigene im Organismus andere Stoffe als Histamin freisetzen können. Die Freisetzung pharmakodynamisch aktiver Körper durch ein bakterielles Gift kann für die Art der Gewebsreaktionen eine Rolle spielen und ist vom Standpunkt der Allgemeinwirkung im Organismus äußerst wichtig. Wenn auch das pharmakologische Bild nicht identisch ist mit dem pathophysiologischen Zustand, kann der pharmakodynamische Mechanismus auf einige pathologische Wirkungsprinzipien hinweisen. Manche entzündliche Erscheinung auf der Basis einer Staphylokokkeninfektion mag erklärt werden u. a. durch eine Freisetzung von Serotonin. Die Rolle des Serotonins als einem möglichen Mediator bei der Entzündung rückt damit in den Vordergrund, wie dies schon bei der experimentellen Entzündung von verschiedener Seite angenommen wird (Benditt und Mitarbeiter, 1955; Mörsdorff und Fehres, 1959). Aber auch die Freisetzung weiterer Substanzen kann von Bedeutung sein. So wird von Chapman (1959) betont, daß Bradykinin in der Pathophysiologie der Entzündung eine Rolle spiele. Dieser Körper von Polypeptidstruktur erhöht die Gefäßpermeabilität (Schachter und Mitarbeiter, 1956, 1960), ein wichtiges Symptom bei der Entzündung. Obgleich es sich beim Bradykinin um ein pharmakologisch ähnliches Prinzip wie bei dem durch Staphylokokkentoxin freigesetzten Körper handelt, ist es nicht mit diesem identisch. Bradykinin wirkt am Kaninchenohr vasodilatatorisch und ist am isolierten Kaninchenherzen ohne Effekt. Da Raškova und Mitarbeiter (1955) auch mit Streptolysin 0 z. T. ähnliche Wirkungen beobachten konnten, wie wir mit Staphylokokkentoxin, ist nicht zu entscheiden, ob es sich bei der Freisetzung von Substanzen aus dem Gewebe um eine spezifische Reaktion handelt.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß zur Kenntnis, Erforschung und Charakterisierung von bakteriellen Toxinen klassische bakteriologische und immunologische Methoden nicht mehr ausreichen. Die künftige Forschung muß sich noch eine breitere Basis schaffen, an der auch Pharmakologen und Biochemiker mitwirken. Die kombinierte Anwendung biologischer, pharmakologischer und chemischer Verfahren bietet die größte Gewähr, dieses Neuland für uns zu erschließen.

VII. Kurze Übersicht

Die Wirkungen von Staphylokokkentoxin (Wood 46) auf isolierte Organe und Zellen wurden systematisch untersucht. Über die letale Aktivität wurde eine Studie durchgeführt.

An glattmuskulären Organen verschiedener Spezies zeigt es eine dosisabhängige Reaktion. Nach einer Latenzzeit von mehreren Sekunden (Verdauungstrakt) bis Minuten (Uterus) kommt es zu einer langsamen Verkürzung des Muskels und zu submaximaler bzw. maximaler Kontraktur. Während niedere Dosen S zu reversiblen Reaktionen führen, ist die Ansprechbarkeit der Organe nach hohen Dosen S reduziert bzw. aufgehoben. S zeigt an isolierten Herzen und Herzvorhofstreifen von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Hühnern positiv- und negativ-inotrope Effekte. Toxische Dosen führen zum systolischen Herzstillstand, an Herzvorhofstreifen wurden nur reversible Wirkungen beobachtet. Im Verlauf der S-Reaktion am isolierten Gefäßpräparat kommt es zu einer starken Gefäßverengerung. Eine antagonistische Beeinflussung der durch S ausgelösten Reaktionen war mit spezifischen und unspezifischen Serotoninantagonisten möglich.

Bei Hämolyseversuchen in vitro nimmt die Empfindlichkeit der Erythrozyten in der Reihenfolge Kaninchen, Katze, Rind, Hammel und Ratte ab. Der Hämolysegrad ist von der Hämolysedauer und der Lysinkonzentration abhängig, die Hämolysegeschwindigkeit wird bei Kaninchen, Katzen und Ratten durch die Zellzahl beeinflußt, während bei Rind und Hammel kein Einfluß der Zellzahl gefunden wurde. Hämoglobin hemmt die S-Hämolyse.

Die pharmakologischen und hämolytischen Befunde werden diskutiert, und es wird versucht, die Wirkungen auf einen gemeinsamen Mechanismus zurückzuführen.

Die letale Aktivität von S zeigt signifikante geschlechtsspezifische Differenzen an weißen Mäusen. Die Empfindlichkeit auf den letalen Faktor von S nimmt in der Reihenfolge Kaninchen, Ratte, Maus ab. Auch das Meerschweinchen reagiert sehr empfindlich auf S.

Die pharmakologische, hämolytische und letale Aktivität von S nimmt mit steigender Lagerungstemperatur ab. Auf 100 °C erhitzte Filtrate von S zeigen keine pharmakologische Aktivität mehr.

LITERATUR

Amin, A. H., T. B. B. Crawford und J. H. Gaddum, J. Physiology **126**, 596 (1954).

Anderson, K., D. M. James und J. Marks, J. of Hyg. **52**, 492 (1954).

Angelucci, L., Nature (London) **181**, 967 (1958).

d'Antona, D., Resum. du VI. Congrès international de standardisation biologique. Brüssel 1958.

Avery, R. C., R. H. Rigdon und J. M. Johlin, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **37**, 131 (1937).

Axelrod, J., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **238**, 31 (1960).

Barsoum, G. S., und J. H. Gaddum, J. Physiology **85**, 1 (1935).

Battacharya, B. K., und G. P. Lewis, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **11**, 202 (1956).

Bayliss, M., J. exp. Medicine **72**, 669 (1940).

Benditt, E. P., S. Bader und K. B. Lam, Arch. Pathology **60**, 104 (1955 a).

Benditt, E. P., R. L. Wong, M. Arase und E. Roeper, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **90**, 303 (1955 b).

Bernheimer, A. W., und G. L. Cantoni, J. exp. Medicine **81**, 307 (1945).

Bernheimer, A. W., J. gen. Physiol. **30**, 337 (1947).

Bernheimer und Mitarbeiter, zit. nach Rašková, 1958.

Bhoola, K. D., I. D. Calle und M. Schachter, J. Physiology **152**, 75 (1960).

Birch-Hirschfeld, L., Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **81**, 260 (1933/34).

Boissonnas, R. A., St. Guttmann, P.-A. Jaquenoud, H. Konzett und E. Stürmer, Experientia **XVI/7**, 326 (1960).

Boivin, A., und Y. Izard, C. R. Soc. biol. **124**, 25 (1937).

Bonnet, H., und St. Thieffry, C. R. Soc. Biol. **118**, 1062 (1935), zit. nach Schmidt.

Borbely, F., Med. Klin., München **54**, 1658 (1959).

Bovet, D., Ann. N. Y. Acad. Sci. **50**, 1089 (1950).

Bozler, E., Experientia (Basel) **4**, 213 (1948).

Brown, D. A., B. N. C. Prichard und J. P. Quilliam, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **14**, 59 (1959).

Bryce, L. M., und P. M. Rountrer, J. Pathol. Bacteriol. **43**, 173 (1936).

Bülbring, E., und A. Crema, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **13**, 444 (1958).

Bülbring, E., und R. C. Y. Lin, J. Physiology **140**, 381 (1958).

Burky, E. L., J. Immunology **24**, 115 (1933), zit. nach Schmidt.

Burn, J. H., Practical Pharmacology, S. 25, Blackwell 1952.

Burnet, F. M., J. Pathol. Bacteriol. **32**, 717 (1929) und **33**, 1 (1930), zit. nach Schmidt, 1940.

Burnet, F. M., und M. Freemann, J. Pathol. Bacteriol. **35**, 477 (1932), zit. nach Feldberg und Kellaway, 1938.

Busch, E., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **228**, 153 (1956).

Butler, L. O., Biochem. J. **71**, 67 (1959).

Chapman, L. F., H. Goodell und H. G. Wolff, Res. XXI. Int. Physiol.-Kongr. Buenos Aires 1959.

Costa, E., Proc. Soc. exp. Biol. Med. **91**, 39 (1956).

Croxatto, H., G. Rojas und L. Barnafi, Science **113**, 494 (1951).

Dalgliesh, C. E., C. C. Toh und T. S. Work, J. Physiology **120**, 298 (1953).

Dolman, C. E., R. J. Wilson und W. H. Cockroft, Canad. publ. Health J. **27**, 489 (1936).

Dworetzky, M., B. R. Zeitlin, M. C. Kahn und H. S. Baldwin, J. Allergy **23**, 359 und 364 (1952).

Dworetzky, M., H. S. Baldwin und M. A. Smart, J. Allergy **27**, 39 (1956).

Elek, S. D., und E. Levy, J. Pathol. Bacteriol. **62**, 541 (1950), zit. nach d'Antona.

Elliot, D. F., und W. S. Peart, Nature (London) **177**, 527 (1956).

Elliot, D. F., G. B. Lewis und E. W. Horton, Biochem. J. **74**, 15 P (1959); J. Physiol. **150**, 6 P (1959).

Erspamer, V., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **200**, 43 (1942).

Erspamer, V., und F. Ghiretti, J. Physiology **115**, 470 (1951).

Erspamer, V., Ricerca sci. **22**, 1568 (1952).

v. Euler, U. S., und J. H. Gaddum, J. Physiology **72**, 74 (1931).

Feinberg, S. M., und L. A. Sternberger, J. Allergy **26**, 170 (1955).

Feldberg, W., und E. V. Keogh, J. Physiology **90**, 280 (1937).

Feldberg, W., H. F. Holden und C. H. Kellaway, J. Physiology **94**, 232 (1938).

Feldberg, W., und C. H. Kellaway, J. Physiology **94**, 187 (1938).

Dies., Austral. J. exp. Biol. med. Sci. **16**, 249 (1938).

Feldberg, W., und L. C. Toh, J. Physiology **119**, 352 (1953).

Feldberg, W., und A. N. Smith, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **8**, 406 (1953); J. Physiology **124**, 219 (1954).

Fink, A. M., Proc. Soc. exp. Biol. Med. **92**, 673 (1956).

Forssmann, J., Biochem. Z. **265**, 288 (1933).

Ders., Acta pathol. microbiol. scand. **11**, 214 (1934); **11**, 452 (1934).

Ders., C. R. Soc. Biol. **117**, 639 (1934).

Ders., Acta pathol. microbiol. scand. **16**, 335 (1939).

Frey, E. K., und H. Kraut, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **133**, 1 (1928).

Gabr, Y., Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **11**, 93 (1956).

Gaddum, J. H., J. Physiology **119**, 363 (1953).

Ders., J. Physiology **121**, 15 P (1953).

Gaddum, J. H., und K. A. Hameed, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **9**, 240 (1954).

Gaddum, J. H., und M. K. Paasonen, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapie **10**, 474 (1955).

Gaddum, J. H., und Z. P. Picarelli, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **12**, 323 (1957).

Garven, J. D., J. Pharmacy Pharmacol. **8**, 256 (1956).

Gengou, O., Ann. Inst. Pasteur **48**, 19 (1932); **48**, 135 (1932).

Ganguly, S. N., zit. nach Kaiser-Michl, S. 173.

Ginzel, K. H., und S. B. Kottegoda, Quart. J. exp. Physiol. **38**, 225 (1953).

Ginzel, K. H., J. Physiology **137**, 62 P (1957).

Glenny, A. T., und M. F. Stevens, J. Pathol. Bacteriol. **40**, 201 (1935).

Greeff, K., und P. Holtz, Arch. int. Pharmacodynam. Therap. **88**, 228 (1951).

Greeff, K., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **236**, 182 (1959).

Gross, H., Klin. Wschr. **11**, 1473 (1932).

Guyon, L., F. Boyer und L. Chedid, Ann. d'Endocrinol. **13**, 752 (1952), zit. nach Rašková.

Gyermek, L., I. Lazar und A. Z. Csak, Arch. int. Pharmacodynam. Therap. **66**, 62 (1956).

Habermann, E., und E. Mölbert, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **223**, 203 (1954).

Háva, M., L. Syruček und H. Rašková, Folia haematol. **73**, 415 (1956).

Háva, M., und M. Mráz, Československ. Farmac. **7**, 129 (1958).

Hartley, P., und M. Llewellyn Smith, zit. nach Schmidt, 1940.

van Heyningen, W. E., „Bacterial Toxins", Blackwell, Oxford 1950.
Higginbotham, R. D., Proc. Soc. exp. Biol. Med. **102**, 4 (1959).
Hobson, D., und S. G. Hirsch, J. exp. Medicine **107**, 167 (1957).
Hoffmann, R. A., und M. X. Zarrow, Amer. J. Physiol. **193**, 547 (1958).
Holdstock, D. J., A. P. Mathias und M. Schachter, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **12**, 149 (1956).
Holt, L. B., Brit. J. exp. Pathol. **17**, 318 (1936).
Howard, J. G., und Wallace, K. R., Brit. J. exp. Pathol. **34**, 181 (1953).
Ivy, A. C., und E. Oldberg, Amer. J. Physiol. **86**, 599 (1928).
Jacobs, M. H., und A. K. Parpart, Biol. Bull. Woods Hole **60**, 95 (1931).
de Jalon, P. G., J. B. Bayo und M. G. de Jalon, Farmacoterap. act. **2**, 313 (1945).
Johanowsky, J., Folia biol. (Praha) **1**, 129 (1955).
Jung, F., und K. Böhm, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **207**, 144 (1949).
Jung, F., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **215**, 600 (1952).
Jung, F., J. Wendler und B. Wiegershausen, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **229**, 281 (1956).
Jung, F., Acta biol. med. germ. **2**, 481 (1959).
Kaiser, E., und H. Michl, Biochemie der tierischen Gifte, Franz Deuticke, Wien 1958.
Kelsey, J. C., und B. C. Hobbs, J. of Hyg. **52**, 502 (1954).
Kind, L. S., J. Immunology **26**, 507 (1955).
Kosterlitz, H. W., und J. A. Robinson, J. Physiology **136**, 249 (1957).
Krawkow-Pissemski, siehe Ther, L., Pharmakologische Methoden, Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart 1949.
Kupchik, G. J., J. infect. Diseases **61**, 320 (1937).
Kusch, T., und E. Kirchner, Acta biol. med. germ. **3**, 368 (1959).
Lane Petter, W., Gen. J. Mikrobiol. Epidemiol. 1959, im Druck.
Langendorff, siehe Ther, L., Pharmakologische Methoden, Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart 1949.
Leitch, J. L., D. Maryn und J. B. Moore, J. Chem. Pharm. Ass. **47**, 535 (1958).
Lembeck, F., Nature (London) **172**, 910 (1953).
Ders., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **221**, 50 (1954).
Ders., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **222**, 235 (1954).
Levine, B. S., J. infect. Diseases **61**, 345 (1937).
Ders., J. Immunology **35**, 131 (1938).
Ders., J. Pathol. Bacteriol. **48**, 291 (1939).
Litchfield, J. T., und F. Willcoxon, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **96**, 99 (1949).
Llewellyn Smith, M., und S. A. Price, a) J. Pathol. Bacteriol. **47**, 361 (1938); b) J. Pathol. Bacteriol. **47**, 379 (1938), zit. nach v. Heyningen, 1950.
Magnus, siehe Ther, L., Pharmakologische Methoden, Wissenschaftl. Verlagsges., Stuttgart 1949.
Mangalo, R., und M. Raynaud, Ann. Inst. Pasteur **97**, 188 (1959).
Mayer, R. L., und D. Brousseau, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **63**, 187 (1946).
Medacovic, M., und B. Radmanovic, J. Pharmacy Pharmacol. **10**, 706 (1958).
Meier, R., J. Tripod und A. Studer, Arch. int. Pharmacodynam. Therap. **117**, 185 (1958).
Mercier, P., C. R. Soc. Biol. **127**, 297 (1938).
Mörsdorf, K., und H. H. Bode, Arch. int. Pharmacodynam. Therap. **68**, 292 (1959).
Mörsdorf, K., und L. Fehres, Med. exp. **1**, 58 (1959).
Morgan, F. G., und J. J. Graydon, J. Pathol. Bacteriol. **43**, 385 (1936).
v. Muralt, Praktische Physiologie, S. 252. Springer-Verlag, Berlin 1948.
Nelis, P., Ann. Inst. Pasteur **52**, 597 (1934), zit. nach Schmidt.
Parker, J. T., J. exp. Medicine **11**, 761 (1924), zit. nach d'Antona, 1958.
Papacostas, C. A., E. R. Loew und G. B. West, Arch. int. Pharmacodynam. Therap. **120**, 353 (1959).
Parratt, J. R., und G. B. West, J. Physiology **134**, 11 P (1956).
Dies., J. Physiology **137**, 169 und 179 (1957).
Dies., Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **13**, 65 (1958).
Payling Wright, G., Proc. Royal. Soc. **46**, 19 (1953), zit. nach Rašková (1958).
Pernow, B., Acta physiol. scand. **29**, 1 (1953).
Picarelli, Z. P., zit. nach Gaddum, Abstr. XX. Internat. Physiolog. Kongreß 1956, S. 450.
Ponder, E., und Kennedy, Biochem. J. **20**, 237 (1926).
Ponder, E., und J. F. Yeager, Biochem. J. **22**, 703 (1928).
Ponder, E., Red Cell Structure and its Breakdown, Protoplasmatologia, X (1955), Springer-Verlag, Wien.
Quevauviller, A., und J. Mainil, J. de Physiol. **41**, 137 (1949).
Rapport, M. M., A. A. Green und I. H. Page, Science **108**, 329 (1948).
Rašková und Mitarbeiter (1956) siehe Háva.
Rašková, H., und J. Vaneček, Science **126**, 700 (1957).
Rašková, H., J. Vaneček und R. Čapek, Čas. Lék. Čes. **96**, 290 (1957).
Rašková, H., und J. Vaneček, Act. Univ. Carol. Medica, S. 943 (1958).
Rašková, H., und Spičak (1957), zit. nach Rašková (1958).
Rašková, H., Pharmacology of some toxins. Publishing House of the Čechoslovak Academy of Sciences, Prague 1958.
Rašková, H., und B. Wiegershausen, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **240**, 37, (1960).
Richmond, J. J., C. T. Reed, H. S. Shaughnessy und V. Michael, J. Bacteriol. **44**, 201 (1942).
Rigdon, R. H., J. infect. Diseases **60**, 25 (1937).
Robertson, P. A., J. Physiology **121**, 54 P (1953).
Rocha e Silva, M., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **194**, 335 (1940).
Rocha e Silva, M., W. T. Beraldo und G. Rosenfeld, Amer. J. Physiol. **156**, 261 (1949).
Rocha e Silva, M., J. R. Valle und Z. P. Picarelli, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **8**, 378 (1953).
Rocha e Silva, M., Polypeptides. Ed. by Gaddum, Livingstone Ltd. 1955, S. 45.
Rowley, D. A., und E. P. Benditt, J. exp. Medicine **103**, 399 (1956).
Rud, E., Acta pathol. microbiol. scand. **36**, 441 (1955).
Schaaf, F., und P. Robert, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **90**, 192 (1937).
Schachter, M., siehe Holdstock bzw. Bhoola.
Schmid, E., L. Zicha, F. Scheiffarth und H. Büttner, Arzneimittel-Forsch. **9**, 474 (1959).
Schmidt, H., Grundlagen der spezifischen Therapie. Bruno Schultz-Verlag, Berlin 1940.
Schöttler, W. H. A., Amer. J. trop. Med. Hyg. **3**, 1083 (1954).
Schur, H., Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 89 (1903).

Sedlák, J., und J. Průchová, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. **116**, 109 (1958).
Seiffert, W., Zbl. Bacteriol., Orig. **135**, 100 (1935).
Sexton, W. A., Chemische Konstitution und biologische Wirkung. Verlag Chemie, 1958.
Silbergeld, S., und H. E. Carter, Arch. Biochem. Biophysics **84**, 183 (1959).
Sisson, J. A., und J. Davies, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **100**, 389 (1959).
Sjoerdsma, A., T. P. Waakles und H. Weisbach, Science **125**, 1202 (1957).
Sparrow, E. M., und D. L. Wilhelm, J. Physiology **137**, 51 (1957).
Stolmakova, A. I., Woprosy Pitanja S. 28 (1954); Bull. exp. Biol. Med. **8**, 58 und **11**, 57 (1957).
Stoufer, R. M., und R. H. Paine, J. Lab. clin. Med. **49**, 312 (1957).
Tuppy, H., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **228**, 101 (1956).
Turner, J. C., J. exp. Medicine **105**, 189 (1957).
Turpin, A., E. H. Relyveld, J. Pillet und M. Raynaud, Ann. Inst. Pasteur **87**, 185 (1954).
Udenfriend, S., H. Weissbach und B. B. Brodie, Methods of Biochemical Analysis. Ed. D. Glick, Vol. 6, S. 109.
Udenfriend, S., IV. Intern. Kongr. Biochemie, Wien 1958, Vortrag Symposion III.
Vane, J. R., Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **12**, 344 (1957).
Vaneček, J., Commun. 1. Konf. d. päd. Fak. Prag, S. 23, 1955.
Vogt, W., J. Physiology **137**, 154 (1957).
Ders., Arzneimittel-Forsch. **8**, 253 (1958).
Votava, Z., I. Podvalova und M. Semonsky, Arch. int. Pharmacodynam. Therap. **115**, 114 (1958).
Waitzová, D., V. Sobek und H. Rašková, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **236**, 35 (1959).
Walaszek, E. J., und C. G. Huggins, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **126**, 258 (1959).
Wallgreen, H., Nature (London) **184**, 726 (1959).
Werle, E., aus Frey, K., N. Kraut und E. Werle, Kallikrein-Padutin, F. Enke-Verlag, Stuttgart 1950.
West, G. B., J. Pharmacy Pharmacol. **11**, 513 (1959).
Wiegershausen, B., Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **228**, 225 (1956).
Ders., a) Acta biol. med. germ. **2**, 284 (1959).
Ders., b) Acta biol. med. germ. **3**, 94 (1959).
Ders., c) Čs. Fysiol. **8**, 465 (1959).
Ders., d) Nature (London) **184**, 2017 (1959).
Ders., a) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **238**, 144 (1960).
Ders., b) Čs. Fysiol. **9**, 308 (1960).
Wilbrandt, W., Schweiz. med. Wschr. **70**, 731 (1940).
Ders., Pflügers Arch. ges. Physiol. **245**, 8 (1941).
Wilbrandt, W., und E. Herrmann, Helv. physiol. pharmacol. Acta **3**, 47 (1944).
Wilhelmi, G., und W. Schindler, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **236**, 50 (1959).
Williams, R. E. O., und G. H. Harper, J. Pathol. Bacteriol. **59**, 69 (1947).
Wittler, R. G., und L. Pillemer, J. biol. Chemistry **174**, 23 (1948).
Yenikeyeva, S. J., und V. D. Rozanova, zit. nach Rašková.
Zetler, G., und L. Schlosser, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **222**, 345 (1954).

(Eingegangen: 14. 2. 1961)

Zusammenfassung

BURKHARD WIEGERSHAUSEN:

Zur Pharmakologie von Staphylokokkentoxin

Es wurden Untersuchungen an isolierten Organen und Zellen sowie eine Studie über die letale Aktivität von Staphylokokkentoxin (Wood 46) durchgeführt. Die pharmakologischen Befunde bringen Hinweise für den Mechanismus der Toxinwirkung.

БУРКГАРД ВИГЕРСГАУЗЕН:

К фармакологии стафилококкового токсина

Проведены исследования на изолированных органах и клетках, а также изучена летальная активность стафилококкового токсина (Wood 46). Фармакологические данные указывают на механизм действия токсина.

BURKHARD WIEGERSHAUSEN:

On the pharmacology of the staphylococcus toxin

Some research has been made on isolated organs and cells and a study on the lethal activity of the staphylococcus toxin (Wood 46). The pharmacological findings reveal the mechanism of the toxic effect.

BURKHARD WIEGERSHAUSEN:

De la pharmacologie de la toxine des staphylocoques

L'auteur a fait des analyses sur des organes et cellules isolés en vue de connaître l'effet de la toxine des staphylocoques (Wood 46) ainsi qu'une étude sur son activité létale. Les résultats pharmacologiques fournissent des éclaircissements sur le mécanisme de l'effet des toxines.